



PROGRAMA DE DOCTORADO

030E BIOQUÍMICA CLÍNICA-MÉDICA E INMUNOLOGÍA (2ª Edición)

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Respuesta inmunológica celular durante el  
tratamiento adyuvante del melanoma con  
Interferón alfa a alta dosis.**

María del Carmen Algueró Martín

Dirigida por:

Dr. Rafael Botella Estrada

Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Octubre 2015





PROGRAMA DE DOCTORADO

030E BIOQUÍMICA CLÍNICA-MÉDICA E INMUNOLOGÍA (2ª Edición)

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Respuesta inmunológica celular durante el  
tratamiento adyuvante del melanoma con  
Interferón alfa a alta dosis.**

María del Carmen Algueró Martín

Dirigida por:

Dr. Rafael Botella Estrada

Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Octubre 2015





Rafael Botella Estrada, Profesor Titular del Departamento de Dermatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, José Enrique O'Connor Blasco, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

INFORMAN: que el trabajo de investigación titulado **“Respuesta inmunológica celular durante el tratamiento adyuvante del melanoma con Interferón alfa a altas dosis”** del que la autora es María del Carmen Algueró Martín, ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular bajo nuestra dirección y supervisión, reuniendo en nuestra opinión todos los requisitos para ser presentado y defendido para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia a 30 de Octubre del 2015.

Fdo. Rafael Botella Estrada Fdo. José Enrique O'Connor



*"Un científico es un hombre tan endeble y humano como  
cualquiera;  
sin embargo, la búsqueda científica puede ennoblecerle,  
incluso en contra de su voluntad"*

*Isaac Asimov*



En primer lugar, quería agradecer a mis directores de Tesis, Dr. Rafael Botella Estrada y Dr. José Enrique O'Connor Blasco por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su apoyo y consejos durante todo estos años.

Al Dr. Eduardo Nagore y a la Dra. Virtudes Soriano del Instituto Valenciano de Oncología, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeras del Laboratorio de Citometría de la Universidad de Valencia, en especial Marta, Nuria, Angie, Laura, Sandra y Soledad, que siempre han estado y espero que estén por mucho tiempo a mi lado.

Quiero agradecer al Dr. Miguel Blanquer, la Dra. Ana García, el Dr. José María Moraleda, la Dra Carmen Insausti y el Dr. Luciano Aniorte el consejo y el apoyo en estos últimos años.

Dar las gracias a mis compañeros de la Sala Blanca (Lola, Cira, Mar y Sandra) que durante este período han cargado con un poquillo de mi trabajo en mi ausencia. Y como no, a mis compañeros de pupitre Javi y Darío, que siempre tiene alguna "palabrica" para hacerme llevar aquellos días...

A mis padres, a mis hermanos, a mis sobrinos, a mi tía Tere porque siempre están ahí.

Y, por último, a esa persona tan especial que está siempre a mi lado Manolo, sabes que sin ti no hubiera sido posible.



## Abreviaturas

| <i>Tabla de abreviaturas</i> |  |
|------------------------------|--|
| ADN                          | <i>Acido desoxirribonucleico</i>   |
| AJCC                         | <i>American Joint Committee on Cancer</i>                                    |
| AKT                          | <i>Proteína quinasa B específica de treonna y serina</i>                     |
| ANTI-GM2                     | <i>Anticuerpos contra el gangliósido tipo 2</i>                              |
| BAGE                         | <i>Antígeno B asociado a melanoma</i>  |
| CD                           | <i>Cluster of differentiation</i>  |
| CLA                          | <i>Antígeno de linfocito cutáneo</i>   |
| CMF                          | <i>Citometría de flujo</i>   |
| CTLA-4                       | <i>Antígeno 4 del linfocito T citotóxico</i>                                 |
| CXCR                         | <i>Receptor de quimiocinas</i>   |
| DAMPS                        | <i>Patrones moleculares asociados a daño molecular</i>                       |
| DC                           | <i>Células dendríticas</i>   |
| E1684                        | <i>Ensayo clínico N° 1684</i>  |
| ECOG                         | <i>Grupo oriental cooperativo de oncología</i>                               |
| EEUU                         | <i>Estados Unidos</i>  |
| ERK                          | <i>Proteínas quinasa reguladas por señales de las matriz extracelular</i>    |
| FcγRIII                      | <i>Receptor de baja afinidad de la región FC de las inmunoglobulinas</i>     |
| FDA                          | <i>Food and Drug Administration</i>  |
| FOXP3                        | <i>Factor de transcripción forkhead-winged-helixe 3</i>                      |
| GAGE                         | <i>Antígeno G asociado a melanoma</i>  |
| G-CSF                        | <i>Factor estimulante de colonias de granulocitos</i>                        |
| GM-CSF                       | <i>Factor estimulante de crecimiento de colonias granulocítico-macrófago</i> |
| GMK                          | <i>Vacuna compuesta por gangliósidos unidos a hemocianina)</i>               |
| ICAM                         | <i>Molécula de adhesión intracelular</i>                                     |
| IFN                          | <i>Interferón-alfa</i>   |
| IL                           | <i>Interleucina</i>  |
| ILT                          | <i>Receptores Leucocitarios tipo Inmuglobulina</i>                           |
| ISGF3                        | <i>Factor estimulador de genes dependientes de INF3</i>                      |
| JAK                          | <i>Quinasa Janus</i>   |
| KIR                          | <i>Receptores inhibidores de la función citotóxica</i>                       |
| MAGE                         | <i>Antígeno asociado a melanoma</i>  |

### Abreviaturas

|               |   |
|---------------|---|
| MAPK          | <i>Proteínas quinasa activada por mitógenos</i>                 |
| MART          | <i>Antígeno melanoma reconocido por linfocitos T</i>            |
| M-CSF         | <i>Factor estimulante de colonias de macrófagos</i>             |
| MDC           | <i>Células Dendrítica Mieloide</i>                              |
| MEK           | <i>Subtipo de MAPK :MAP quinasa quinasa quinasa 1</i>           |
| MHC           | <i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>                    |
| MIFT          | <i>Factor de transcripción asociado a la microftalmia</i>       |
| MUM           | <i>Antígeno asociado a melanoma mutado</i>                      |
| NK            | <i>Natural Killer</i>   |
| OS            | <i>Supervivencia total</i>                                      |
| PAMPS         | <i>Patrones moleculares asociados a patógenos</i>               |
| PDC           | <i>Célula Dendrítica Plasmocitoide.</i>                         |
| PDL           | <i>Ligandos de muerte programada</i>                            |
| Peg-INF       | <i>Pegylated interferon-alpha-2b</i>                            |
| RFS           | <i>Supervivencia libre de enfermedad</i>                        |
| STAT          | <i>Transductor de la señal y activador de la señal</i>          |
| Tc            | <i>Linfocitos T citotóxicos</i>                                 |
| TCR           | <i>Receptor de célula T</i>                                     |
| Th            | <i>Linfocitos T helper</i>                                      |
| TLR           | <i>Receptor de tipo Toll</i>                                    |
| TNF- $\alpha$ | <i>Factor de necrosis tumoral</i>                               |
| TNM           | <i>Tumor, nódulo( ganglio) y Metástasis</i>                     |
| Treg          | <i>T reguladores</i>  |
| TRP           | <i>Proteínas relacionadas con la biosíntesis de la tirosina</i> |
| TRYP          | <i>Antígeno contra tirosinasa</i>                               |
| VCAM          | <i>Molécula de adhesión vascular</i>                            |

# **1 ÍNDICE**

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2     | INTRODUCCIÓN.....  | 17 |
| 2.1   | Melanoma.....  | 17 |
| 2.1.1 | Melanocito.....  | 17 |
| 2.1.2 | Desarrollo Melanoma.....   | 18 |
| 2.1.3 | Incidencia del melanoma.....   | 21 |
| 2.1.5 | Principales tipos de terapia frente al melanoma.....   | 24 |
| 2.2   | Inmunología del Melanoma.....  | 28 |
| 2.2.1 | Sistema inmune en la piel.....   | 28 |
| 2.2.2 | Respuesta Inmune frente al melanoma.....   | 29 |
| 2.2.3 | Capacidad Inmunogénica del Melanoma.....   | 35 |
| 2.2.4 | Mecanismos de evasión tumoral en el melanoma.....  | 36 |
| 2.2.5 | Inmunoterapias aprobadas en la actualidad.....   | 38 |
| 2.2.6 | Efectos adversos asociados a la inmunoterapia (INF- $\alpha$ )47                             |    |
| 2.2.7 | Citometría de Flujo aplicada al estudio del sistema<br>inmunitario en sangre periférica..... | 48 |
| 3     | HIPÓTESIS.....   | 53 |
| 4     | OBJETIVOS.....   | 55 |
| 5     | MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 57 |
| 5.1   | Material.....  | 57 |
| 5.2   | Métodos.....   | 59 |
| 5.2.1 | Poblaciones linfocitarias.....   | 59 |
| 5.2.2 | Identificación de las poblaciones de células dendríticas<br>mieloide y plasmocitoide.....    | 61 |
| 5.2.3 | Toma de muestras.....  | 62 |
| 5.2.4 | Preparación de las muestras.....   | 62 |

Índice

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.2.5 | Adquisición de datos por citometría de flujo:.....   | 63  |
| 5.3   | Análisis de datos.....   | 64  |
| 5.4   | Análisis estadístico.....  | 69  |
| 6     | RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.....  | 71  |
| 6.1   | Estudio comparativo de las poblaciones leucocitarias y las subpoblaciones linfocitarias y de células dendríticas en individuos sanos y pacientes con melanoma antes de tratamiento.....  | 74  |
| 6.1.1 | Estudio comparativo entre individuos sanos y pacientes con melanoma.....   | 74  |
| 6.1.2 | Estudio comparativo en pacientes con melanoma en diferentes estadios. ....   | 75  |
| 6.1.3 | Relevancia biológica y/o clínica de los resultados.....  | 78  |
| 6.2   | Estudio comparativo de las poblaciones leucocitarias y las subpoblaciones linfocitarias y de células dendríticas en pacientes con melanoma sometidos a tratamiento.....  | 84  |
| 6.2.1 | Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo. ....   | 85  |
| 6.2.2 | Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según el estadio al diagnóstico (EstadiosII y III). ....   | 91  |
| 6.2.3 | Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario.   | 100 |
| 6.2.4 | Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según presencia o ausencia de respuesta inmunitaria reactiva (vitíligo y/o anticuerpos autoinmunitarios). .... | 107 |

## Índice

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 6.2.5 | Estudio de las variaciones durante la fase de inducción en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según presencia o ausencia de recidiva.....                                  | 115 |
| 6.2.6 | Relevancia biológica y/o clínica de los resultados. ....   | 122 |
| 6.3   | Aplicación de la estrategia bioinformática del análisis de clústers jerárquicos para integrar los parámetros de poblaciones inmunitarias con los principales parámetros clínicos de los pacientes..... | 126 |
| 6.3.1 | Clasificación de pacientes aplicando el método multivariante de Análisis de Clústers Jerárquicos.....  | 129 |
| 6.3.2 | Relevancia biológica y/o clínica de los resultados. ....   | 136 |
| 7     | CONCLUSIONES.....  | 137 |
| 8     | BIBLIOGRAFIA.....  | 141 |

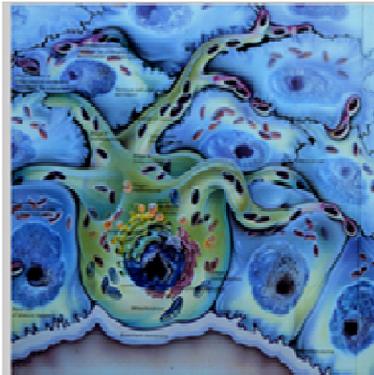


## **2 INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Melanoma.**

#### **2.1.1 Melanocito**

El melanoma es una neoplasia maligna derivada de los melanocitos, células que se localizan principalmente en la dermis. El precursor de los melanocitos es el melanoblasto, que migra durante el desarrollo embrionario a partir de los extremos dorsales de la cresta neuronal dirigiéndose a varios tejidos como el iris y el corioide del ojo, el oído interno, la dermis y la epidermis. Los melanoblastos, una vez situados en los tejidos, progresan desde el estrato intradérmico al estrato supra-basal epidérmico, y de ahí al estrato intra-epidérmico basal, seguido de la colonización folicular. Durante el proceso de migración, entre las semanas 15-17 del desarrollo embrionario, se produce la diferenciación de melanoblasto a melanocito; en este período el melanoblasto comienza a inducir factores de diferenciación melanocítica entre ellos: el factor de transcripción asociado a microftalmia (MIFT) que contribuye a la expresión de tirosinasa (Gleason et al., 2008), proteínas relacionadas con la formación de tirosina (TRP) y la dopracromo-tautomerasa, todas ellas enzimas necesarias para la biosíntesis de la melanina que va a ser acumulada en los melanosomas. Los melanocitos se caracterizan por su morfología ovoide y la emisión de proyecciones en forma de dendritas que le van a aportar una mayor superficie celular para entrar en contacto con los queratinocitos adyacentes (ratio 1:40), formando una red de conexiones complejas cuya principal finalidad es el tráfico de la melanina contenida en los melanosomas entre ambos tipos celulares (Figura 1).



**Figura 1.**-Imagen unidad melano-epidérmica formado por melanocitos y queratinocitos. Imagen obtenida de MV-III - Histoembriología-R.G ( Junio 2003)

### 2.1.2 Desarrollo Melanoma

El modelo de Clark describe los cambios histológicos que acompañan la progresión del melanoma (Figura 2). Según este modelo se define un primer cambio fenotípico en los melanocitos denominado *nevus* benigno, este se puede desarrollar de forma congénita o ser adquirido durante la vida. Los *nevus* benignos se originan debido a la proliferación controlada de células de carácter clonal que aún expresan un fenotipo melanocítico. Se cree que la ausencia de progresión a melanoma puede deberse a genes inductores de la senescencia. En el nivel molecular se observa en el *nevus* benigno un aumento de la activación de dos vías con actividad quinasa: una de ellas implicada en la activación de la mitosis celular (MAPK) (Cohen et al., 2002) y una segunda vía implicada en la unión de la células con la matriz extracelular (ERK) (Uribe et al., 2006). La activación de ambas está relacionada con mutaciones somáticas tanto en el gen N-Ras (asociado a *nevus* congénito y al 15% de los melanomas), o en el gen B-Raf (asociado *nevus* adquirido y al 50% de los melanomas). Mutaciones adicionales a las ya mencionadas darían lugar a un segundo estadio, los

denominados *nevus* displásicos, caracterizados por un crecimiento aberrante y citología atípica. En este punto se pierde la arquitectura normal del tejido donde se sitúan. La base molecular de los *nevus* displásicos está relacionada con mutaciones en los genes *CDKN2A* (Kiszner et al., 2014) y *PTEN* (Kotelevets et al., 2001), ambos genes implicados en la supresión tumoral. *CDKN2A* participa en la replicación celular controlando la transición entre las fases G1 y S; por otro lado el gen *PTEN* controla la activación del crecimiento celular. Las mutaciones en el gen *PTEN* generan la desregulación del control de la actividad de la vía de la *AKT*, dando lugar a una inactivación de los factores que controlan la supresión del ciclo celular o de aquellos que estimulan la apoptosis frente a un daño celular.

Posiblemente el conjunto de mutaciones mencionadas, junto a cambios en la expresión de moléculas implicadas en la unión célula-célula como son las caderinas, como también las integrinas proteínas de la unión célula-matriz extracelular e incluso la expresión metaloproteinasas, enzimas que degradan la matriz extracelular, favorecerán la proliferación incontrolada de las células que originan el melanoma cuyo crecimiento se puede diferenciar en tres fases según el modelo de Clark:

- Proliferación a través de la epidermis (fase de crecimiento radial),
- Proliferación invadiendo la dermis (fase de crecimiento vertical),
- Proliferación y migración a otros órganos (metástasis) (Ding et al., 2014).

No está muy claro el origen del melanoma, se cree que inicialmente podrían existir una serie de mutaciones que se acumulan en una célula stem quiescente de estirpe melanocítica (melanoblasto), y eventualmente diferentes señales ambientales apropiadas podrían activar la proliferación celular aberrante debido a las mutaciones y, dependiendo de la naturaleza de éstas, podría desarrollarse el melanoma in situ o, por el contrario, haber una fase previa de *nevus* benigno, que requiere mutaciones transformantes adicionales que acabarían por provocar el desarrollo del melanoma.

Los factores de crecimiento epidérmicos podrían favorecer una mayor proliferación y diferenciación del melanoma. Las sucesivas mutaciones acumuladas podrían dar lugar a diferentes subclones de células tumorales, con mayor independencia del sustrato y de los factores de crecimiento. Como consecuencia las células adquieren patrones aberrantes de migración e invaden la dermis e incluso los nervios y vasos linfáticos.

| Estadio            | Nevus Benigno                   | Nevus Displásico                                      | Fase crecimiento radial  | Fase crecimiento vertical                                       | Metástasis Melanoma  |
|--------------------|---------------------------------|---|--|---|--|
| Epidermis          |                                 |   |  |   |  |
| Membrana basal     |                                 |   |  |   |  |
| Dermis             |                                 |   |  |   |  |
| Eventos Biológicos | Benigno<br>Crecimiento limitado | Pre-maligno<br>Lesiones que pueden regresar<br>Atipia | Baja diferenciación<br>Hiperplasia no delimitada<br>Proliferación clonal | Baja diferenciación<br>Infiltra Membrana Basal<br>Forma tumoral | Baja diferenciación.<br>Se diferencia del tumor primario<br>Crece en órganos distantes |

**Figura 2** Estratificación de la proliferación clonal de melanocitos desde el nevus benigno hasta la metástasis del melanoma. (Adaptada de Miller A J , et al. New Engl J2006, 355: 51-56

### **2.1.3 Incidencia del melanoma**

La incidencia del melanoma, en el nivel global, es 10 veces más frecuente en la raza blanca y su distribución es similar entre hombres y mujeres menores de 65 años. Por encima de esa edad, la frecuencia en los hombres es dos veces mayor que en las mujeres, siendo el 5º tumor más frecuente en el hombre y el 6º en la mujer.

La mayor incidencia se registra en países con fuerte irradiación solar y con una población blanca no autóctona (Australia, Nueva Zelanda, USA y Sudáfrica). La incidencia en Europa es menor. En los últimos años la incidencia del melanoma tiende a estabilizarse e incluso a disminuir en países como Australia; en Europa, por el contrario, sigue aumentando en el Sur y el Este.

En España se diagnostican unos 3.600 nuevos casos anuales, a cualquier edad, aunque la prevalencia está entre 40-70 años. La incidencia en nuestro país se puede considerar alta (5,3 nuevos casos/100.000 habitantes/año en hombres y 5,5 en mujeres).

En los países desarrollados se ha producido un incremento del 81% de nuevos casos de melanoma en los últimos años. Este aumento está relacionado directamente con la mayor exposición al sol o por la utilización de métodos artificiales de bronceado. A pesar del aumento de los casos, la mortalidad permanece estable, debido fundamentalmente a la mejor prevención, diagnóstico y tratamiento.

El melanoma es uno de los tumores con mejor pronóstico en el caso de que se diagnostique de forma precoz (98% de supervivencia en 5 años) y siempre y cuando el melanoma no se haya diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o a otras partes del cuerpo.

#### 2.1.4 Clasificación del Melanoma.

La última clasificación de los diferentes estadios del melanoma se publicó en 2009 por " *The American Joint Committee on Cancer (AJCC)*". En ella se incluyen los datos proporcionados por un estudio prospectivo de 38.918 melanomas. El análisis estadístico del estudio resaltó el valor de la ratio de mitosis del tumor primario (medida histológica del número mitosis/mm<sup>2</sup>) como un valor independiente y que está inversamente relacionado con la supervivencia, por lo que en el actual sistema de clasificación se halla incluido (Balch et al., 2009), (Gershenwald et al., 2010).

La estratificación del melanoma se realiza en base a la clasificación TNM: el espesor, la ulceración, las mitosis, la afectación ganglionar y la existencia de metástasis: Tabla 1a .

Por otro lado, la clasificación de los estadios clínicos y patológicos del melanoma está relacionada con la estratificación del tumor. (Tabla 1b)

- ✓ Estadio 0: aquellas lesiones que no invaden la dermis. Son lesiones in situ y por lo tanto sin potencialidad de desarrollar metástasis por lo que no afectan a la supervivencia.
- ✓ Estadios I y II: toman relevancia en estos el espesor y la existencia o no de ulceración. Además, para aquellos cuyo espesor es bajo, cobra importancia el índice de mitosis.
- ✓ Estadio III: son aquellos melanomas que presentan metástasis de zonas en forma de metástasis ganglionares regionales, en tránsito o satélitosis

## Introducción

- ✓ Estadio IV: son aquellas que presentan metástasis distales.

| <b>Tabla 1a.-Clasificación TNM (Tumor, ganglio, metástasis)</b>                                     |  |   |
|---|--|---|
| <b>Clasificación T</b>  | <b>Espesor (mm)</b>  | <b>Estratificación adicional</b>  |
| <b>TIS</b>  | NA   | NA  |
| <b>T1</b>   | ≤1.00  | a: sin ulceración y sin mitosis < 1 mm <sup>2</sup>                       |
|   |  | b: con ulceración y sin mitosis < 1 mm <sup>2</sup>                       |
| <b>T2</b>   | 1.01-2.00  | a: sin ulceración   |
|   |  | b: con ulceración   |
| <b>T3</b>   | 2.01-4.00  | a: sin ulceración   |
|   |  | b: con ulceración   |
| <b>T4</b>   | >4.00  | a: sin ulceración   |
|   |  | b: con ulceración   |
| <b>Clasificación N</b>  | <b>Nº de ganglios positivos</b>  | <b>Tipo de metástasis</b>   |
| <b>N0</b>   | 0  | NA  |
| <b>N1</b>   | 1  | a: Micrometástasis*   |
|   |  | b: Macrometástasis <sup>xy</sup>  |
| <b>N2</b>   | 2-3  | a: Micrometástasis  |
|   |  | b: Macrometástasis  |
|   |  | c: Metástasis en tránsito / presencia de satélites sin ganglios positivos |
| <b>N4</b>   | 4+ ganglios positivos, o metástasis en tránsito/ o presencia de satélites con ganglios positivos |   |
| <b>Clasificación M</b>  | <b>Lugar de Metástasis</b>   | <b>Niveles en suero de LDH</b>  |
| <b>M0</b>   | No hay metástasis distales   | NA  |
| <b>M1a</b>  | Metástasis zonas distales de la Piel , subcutánea o metástasis en ganglios                       | Normal  |
| <b>M1b</b>  | Metástasis pulmonar  | Normal  |
| <b>M1c</b>  | Otros órganos  | Normal  |
|   | Varias metástasis distales   | Elevada   |
| Abreviaturas: NA - no aplica, LDH - lactato deshidrogenasa  |  |   |
| * diagnosticadas después de la biopsia del ganglio centinela  |  |   |
| <sup>y</sup> son detectadas clínicamente y posteriormente confirmadas mediante estudios patológicos |  |   |

| <b>Tabla 1b.- Clasificación clínica y patológica del melanoma</b> |                |     |    |                           |                |                |    |
|---|----------------|-----|----|---------------------------|----------------|----------------|----|
| <i>Estadio clínico</i>  |                |     |    | <i>Estadio patológico</i> |                |                |    |
|   | T              | N   | M  |                           | T              | N              | M  |
| <b>0</b>  | Tis            | N0  | M0 | <b>0</b>                  | Tis            | N0             | M0 |
| <b>IA</b>   | T1a            | N0  | M0 | <b>IA</b>                 | T1a            | N0             | M0 |
| <b>IB</b>   | T1b            | N0  | M0 | <b>IB</b>                 | T1b            | N0             | M0 |
|   | T2a            | N0  | M0 |                           | T2a            | N0             | M0 |
| <b>IIA</b>  | T2b            | N0  | M0 | <b>IIA</b>                | T2b            | N0             | M0 |
|   | T3a            | N0  | M0 |                           | T3a            | N0             | M0 |
| <b>IIB</b>  | T3b            | N0  | M0 | <b>IIB</b>                | T3b            | N0             | M0 |
|   | T4a            | N0  | M0 |                           | T4a            | N0             | M0 |
| <b>IIC</b>  | T4b            | N0  | M0 | <b>IIC</b>                | T4b            | N0             | M0 |
| <b>III</b>  | Cualquier<br>T | N>0 | M0 | <b>IIIA</b>               | T1-4a          | N1a            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4a          | N2a            | M0 |
|   |                |     |    | <b>IIIB</b>               | T1-4b          | N1a            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4b          | N2a            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4a          | N1a            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4a          | N2a            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4a          | N1c            | M0 |
|   |                |     |    | <b>IIIC</b>               | T1-4b          | N1b            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4b          | N2b            | M0 |
|   |                |     |    |                           | T1-4b          | N1c            | M0 |
|   |                |     |    |                           | Cualquier<br>T | N3             | M0 |
|   |                |     |    | <b>IV</b>                 | Cualquier<br>T | Cualquier<br>N | M1 |

### 2.1.5 Principales tipos de terapia frente al melanoma.

Los índices de supervivencia en los pacientes con melanoma están estrechamente ligados a un diagnóstico y una cirugía precoz. La escisión quirúrgica del tumor primario es suficiente para conseguir la curación en el 90% de los pacientes portadores de un tumor localizado y con bajo espesor; sin embargo, las tasas de supervivencia descienden en aquellos pacientes en los que aumenta el espesor del tumor y, sobre todo, cuando los ganglios linfáticos loco-regionales de drenaje están afectados, estadios III y IV: en estos casos el riesgo de recurrencia es alto, por lo que adquieren importancia las terapias adyuvantes focalizadas en el tratamiento de la enfermedad residual que el paciente

pueda presentar a pesar de no detectarse con las pruebas habituales de laboratorio e imagen disponibles en la actualidad..

En la actualidad las terapias más utilizadas son :

Inmunoterapia

Radioterapia

Quimioterapia

#### 2.1.5.1 ***Inmunoterapia***

La inmunoterapia surge hace un siglo, cuando el Dr William observó la regresión tumoral en aquellos pacientes que desarrollaban infecciones después de realizarles la cirugía del tumor (Green and Ariyan, 2015). Esto le hizo deducir que la respuesta inmune frente a la bacteria ataca al mismo tiempo a las células tumorales. Posteriormente realizó infecciones con dicha bacteria en pacientes a los que no se les realizó una limpieza total del tumor. No obtuvo resultados óptimos ya que algunos de los pacientes murieron debido a la infección.

Siguiendo en la misma línea de la inmunoterapia dicho investigador experimentó con la inyección intratumoral de bacterias liofilizadas; a esta inyección se le denominó vacuna de Colley. La aparición de la radioterapia y los agentes citotóxicos provocó que se abandonará esta línea de investigación. Sin embargo, durante las dos últimas décadas vuelve a aparecer la inmunoterapia como terapia adyuvante en distintos cánceres. Durante la reaparición se intenta estudiar los dos campos: la capacidad inmunogénica de los tumores y las características del sistema inmune, para poder aumentar la respuesta antitumoral. Estos eventos se describen en capítulos posteriores.

### 2.1.5.2 **Radioterapia.**

La radioterapia no está recomendada en el tumor primario. Hasta hace unos años se creía que las células del melanoma eran resistentes a la radioterapia; recientemente estudios in vitro han demostrado que hay cierta respuesta a la radioterapia si esta es aplicada en dosis más altas que las indicadas en otros tipos de tumores.

Se contempla la posibilidad de utilizar la radioterapia como terapia adyuvante tras la linfadenectomía, con objeto de controlar la recurrencia localizada en melanomas de alto riesgo como son los de Estadio III con los siguientes parámetros (Wushou et al., 2015):

- Ganglios: Positividad en al menos 4, con extensión extra-capsular y positividad en los márgenes.
- Localización de células tumorales en ganglios cervicales.
- Tamaño de la zona tumoral de más de 3mm.

Existen discrepancias en los resultados retrospectivos obtenidos en los últimos años, habiendo aparecido mejoría en la zona donde se aplica la radioterapia, aunque no se han obtenido resultados en la supervivencia total.

### 2.1.5.3 **Quimioterapia.**

El agente quimioterapéutico más utilizado para el tratamiento del melanoma ha sido la *Dacarbazina*, un agente quelante del grupo de las triazinas que actúa produciendo daño celular en el nivel del ADN, impidiendo la proliferación celular mediante la inducción de la apoptosis; aunque hay que advertir que este daño no es específico, ya que afecta a células, tejidos y órganos no afectados por el tumor como

pueden ser las células hematopoyéticas, la piel, las mucosas, el estómago, los folículos pilosos. etc, lo que provoca diferentes efectos adversos debido a su citotoxicidad.

Por este motivo se comenzó a explorar la utilización de pro-drogas de la *Dacarbazina* como la *Temozolamida*. Un estudio pre-clínico comparando ambas drogas demostró que su efecto es similar. Los efectos adversos eran menores en el caso de la *Temozolamida* (Patel et al., 2011).

Nuevas drogas han surgido del conocimiento de la biología molecular asociada al tumor; por ello podemos distinguir a los inhibidores de la vía de la MAP Kinasa implicada en la proliferación celular:

- ✓ *Vemurafenib* y *Drabrafenib*: son moléculas que inhiben la quinasa Braf Mutada, Aprobadas por la FDA en 2011y 2013 respectivamente (2012) y (Ballantyne and Garnock-Jones, 2013).. Aproximadamente el 50% de los melanomas poseen mutado el gen *Braf*.
- ✓ *Trametinib* y *Cobimetinib*: Inhibidores de quinasa MEK. (Wright and McCormack, 2013).

En la actualidad se están utilizando de forma conjunta inhibidores de Braf y de MEK para bloquear de forma completa la vía de la MAP Quinasa y evitar resistencias. (Ascierto et al., 2015).

## 2.2 Inmunología del Melanoma

### 2.2.1 Sistema inmune en la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano; no solo actúa como barrera física frente patógenos externos (microorganismos, parásitos..), sino que en ella se encuentran células del sistema inmune pertenecientes tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa, que forma una red compleja cuya finalidad es eliminar dichos patógenos antes de que invadan otros órganos. La mayor parte de las células del sistema inmune se encuentran localizadas en la dermis papilar, formada por mastocitos, células T, monocitos y sus derivados, como pueden ser los macrófagos y células dendríticas (Bos and Luiten, 2009). La finalidad de estas células es la inmunovigilancia por lo que no sólo van a reconocer como extraño los agentes externos sino a las células tumorales.

En las células especializadas en la inmunovigilancia de la piel juegan un papel importante los receptores tipo Toll (TLR). Los TLR se encuentran en la membrana plasmática de las células implicadas en la respuesta inmune: células del sistema inmune, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos y adipocitos. Estos receptores cobran importancia tanto en la patofisiología de la inflamación como en las neoplasias de la piel (Cui et al., 2014) (Burns and Yusuf, 2014).

Los TLR actúan como moléculas de señalización, reconociendo secuencias comunes a diversos patógenos: los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPS*), o patrones moleculares asociados a daño celular (*DAMPS*). En cuanto a estructura de los TLR cabe destacar que son glicoproteínas transmembranales de tipo I que comparten un dominio en el citoplasma produciendo una cascada de

reacciones en el interior celular cuyo fin es la activación de la respuesta inmune innata a través del factor de transcripción *NF- $\kappa$ B* (Akira and Hemmi, 2003).

## 2.2.2 Respuesta Inmune frente al melanoma

### 2.2.2.1 Respuesta inmune innata

#### ✓ Queratinocitos

Los queratinocitos juegan un papel clave en la inmunovigilancia de la piel ya que tienen la capacidad de producir un amplio rango de citocinas que van a desencadenar tanto la activación como la inactivación del sistema inmune. Las citocinas producidas por los queratinocitos son la IL-1, IL-6, IL-10, IL12, IFN- $\alpha/\beta$ , el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ , el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  y la  $\beta$ -defensina. Varios estímulos externos o internos pueden desencadenar la producción de estas moléculas capaces de controlar la proliferación, migración y activación de linfocitos, mastocitos, células dendríticas y macrófagos en la piel (Kupper and Fuhlbrigge, 2004).

#### ✓ Células Dendríticas

Las células dendríticas forman parte del sistema inmune, son las principales reguladores de la inmunidad en la piel y son el nexo de unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Steinman, 1991).

En la piel podemos encontrar varios subtipos de células dendríticas:

1. Las células de Langerhans: se consideran un subtipo de células dendríticas que residen principalmente en la epidermis. La morfología es característica, con unos gránulos citoplasmáticos en forma de raqueta de tenis , denominados gránulos de *Birbeck*. (Valladeau et al., 2000). Se les considera potentes inductores de la respuesta inmune T. Se dividen en tres grupos dependiendo de su estadio de maduración: Se dividen en tres grupos dependiendo de su estadio de maduración:

- Células de Langerhans Inmaduras: se caracterizan por tener baja capacidad de presentación antigénica debido a la baja expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II y también por la ausencia de expresión de moléculas CD80 y CD86; aunque poseen una gran capacidad endocítica y migratoria.
- Células de Langerhans Activadas: son células en un estadio más maduro. Son células dendríticas que han reconocido una señal como patógena o extraña la cual provoca la pérdida de expresión de E-caderina y causa de la secreción de metaloproteinasas y de la expresión CXCR7 que les va a permitir la migración al ganglio linfático más cercano (Wilson and Villadangos, 2004).
- Células de Langerhans Maduras: Son células capaces de producir la activación de los Linfocitos T vírgenes en los ganglios, mediante la expresión de antígenos patógenos o extraños asociados a las moléculas de histocompatibilidad y a la coestimulación de las células T mediada por las moléculas CD80 y CD86. Esta activación específica de los

linfocitos T permite que estos adquieran capacidad de dirigirse a la piel inflamada, y una vez situados en el foco inflamatorio proliferarán clonalmente diferenciándose a linfocitos T efectores y por último a linfocitos T de memoria.

2. Las células dendríticas dérmicas: son células cuya función en la actualidad no está muy clara. Se caracterizan, al contrario que las células de *Langerhans*, por la ausencia de gránulos de Birbeck y de langerina y además por la expresión de Factor XIIIa (Nestle et al., 1993).
3. Células dendríticas plasmocitoides: este subtipo celular es la subpoblación minoritaria dentro del grupo de las células dendríticas. Las podemos encontrar en sangre, timo, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo. Normalmente no se localizan en la piel, aunque pueden infiltrar la dermis bajo ciertas condiciones patógenas asociadas a la activación del sistema inmune como ocurre en la psoriasis, lupus eritromatoso o ciertos tumores sólidos (Colonna et al., 2004), (Vermi et al., 2011). Se caracterizan por reconocer nucleótidos virales mediante la expresión de los TLR tipo 3, 7, 8 y 9 y por producir INF- $\alpha$  en altas cantidades. Por el contrario, no se activan frente a DNA de tipo endógeno. Estudios realizados en psoriasis han determinado su implicación asociada a una respuesta inmune patológica. Se ha observado que un posible daño celular provocado en los queratinocitos produce la liberación del péptido antimicrobial llamado LL37; este es reconocido por el TLR9 de las células dendríticas plasmocitoides las cuales producen una respuesta robusta mediada por INF- $\alpha$ . (Lande et al., 2007).

Las células dendríticas se consideran los principales vigilantes cutáneos, ya que no sólo van a presentar antígenos extraños procedentes de patógenos a las células T, sino que activan el sistema inmune frente a cualquier *señal peligrosa*, como pueden ser los tumores.

### 2.2.2.2 **Respuesta Inmune adaptativa**

#### ✓ Linfocitos T

Los linfocitos T son células del sistema inmune cuyo precursor, la célula *stem* hematopoyética, se encuentra en la médula ósea, en ella tiene lugar la diferenciación a linfocitos T vírgenes. Posteriormente los linfocitos T vírgenes son estimulados en el ganglio de forma adecuada por las células dendríticas de *Langerhans* los cuales maduran hacia linfocitos T efectores que serán reclutados en la piel inflamada.

Los linfocitos T efectores se dirigen hacia la piel, debido a una cascada de mecanismos en que los queratinocitos actúan como iniciadores de la inflamación, liberando diferentes citocinas y factores pro-inflamatorios como la IL-1 y el TNF- $\alpha$ . Estos factores inducen a su vez, en las células endoteliales de dicha región de la piel, la expresión de moléculas de adhesión E-selectina, VCAM-1, ICAM-1 (Nestle et al., 2009).

La expresión de las moléculas de adhesión permite la extravasación hacia el foco inflamatorio, de forma específica a aquellos linfocitos con tropismo cutáneo, los cuales se caracterizan por la expresión en su superficie de la molécula CLA. Esta proteína de superficie se une específicamente a la E-selectina expresada en las células endoteliales, que van a permitirle la entrada de los linfocitos T circulantes hacia la piel inflamada (Masopust and Schenkel, 2013).

El CLA es un receptor de asentamiento cutáneo, presente en los linfocitos T de memoria circulantes, cuya expresión depende de la activación de los linfocitos T vírgenes por las células presentadoras de antígeno en los ganglios linfáticos asociados a la piel. Estos ganglios se caracterizan por tener un microambiente específico de factores de crecimiento y citocinas como son el TGFβ1 y la IL-6.

Los Linfocitos T CLA<sup>+</sup> de la piel pueden ser: linfocitos T *helper* caracterizados fenotípicamente por poseer la molécula coestimuladora CD4<sup>+</sup> en su membrana o linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>); la distribución de ambas subpoblaciones no es homogénea, sino que los linfocitos TCD4<sup>+</sup> predominan en la dermis y se localizan principalmente alrededor de los vasos, mientras que los linfocitos TCD8<sup>+</sup> se encuentran en la epidermis (Pasparakis et al., 2014).

Las principales funciones de los linfocitos T en la piel son las siguientes: inmunovigilancia, que garantiza el combate contra patógenos que amenazan la integridad de la piel y la homeostasia que previene las respuestas inmunitarias destructoras del tejido contra antígenos inocuos o autoantígenos.

Los linfocitos T reguladores (Treg) se originan en el timo. Son los cuales son una población minoritaria definida inicialmente por Gershon en 1971 como : linfocitos T con fenotipo CD3CD4CD25<sup>+</sup> que realizan un efecto supresor durante la activación en linfocitos T autorreactivos (Gershon and Kondo, 1971).

A mediados de los años 90, el interés por este tipo celular aumentó debido a las observaciones realizadas por el grupo Sakaguchi, en las que demostró que una subpoblación minoritaria de linfocitos T, cuyo fenotipo se caracterizaba por la coexpresión CD4 CD25<sup>+</sup>,

funcionaba como células T reguladoras, las cuales suprimían la autoinmunidad en un modelo *murino* (Sakaguchi et al., 1995). Este y otros datos sugirieron la existencia de un Linfocito T supresor originado en el timo, cuya principal función es el mantenimiento de la autotolerancia periférica. (Figura 3).

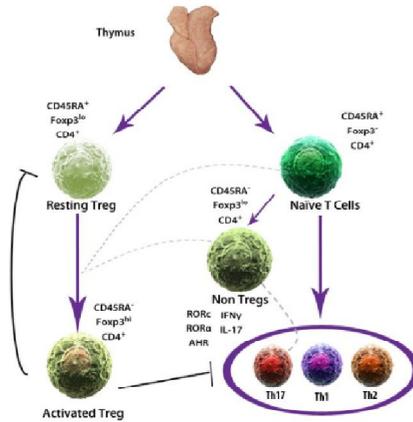
La comprensión de la biología de los linfocitos T reguladores comenzó en 2003 cuando se descubrió que estas células poseían el factor de transcripción *forkhead-winged-helixe 3* (FoxP3), factor que juega un papel importante en la función y en el desarrollo Tregs. Este factor un marcador de linaje específico y regulador maestro de las Tregs (Hori et al., 2003).

Estudios recientes han demostrado que existe correlación entre la expresión negativa del receptor de IL-7 (CD127) y la expresión de FoxP3<sup>+</sup>, por lo que podían identificarse de ambas formas (Liu et al., 2006).

Estudios *in vitro* de las mutaciones en el gen Foxp3 han demostrado que están relacionadas con la ausencia de células Tregs y la aparición de enfermedades autoinmunes y, por el contrario, un aumento de células Tregs está asociado a un incremento de la supresión inmune (Bacchetta et al., 2007).

Nuevas evidencias demuestran que las células Tregs residen en la epidermis tanto en reposo como en condiciones inflamatorias, dividiéndose en dos poblaciones: aquellas células Tregs que se encuentran inmóviles y aquellas que migran activamente a lo largo de la dermis. En ausencia de inflamación, la población migratoria representa <10% de las células Tregs, aumentando esta población en caso de procesos inflamatorios. Posiblemente en la piel se encuentra la inmensa

mayoría de las células Tregs no circulantes. De este hecho se podría inducir que en la piel existe una mayor regulación de los procesos inflamatorios (Chow et al., 2013).



**Figura 3.-** Subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (Adaptado de Miyara M., et al. 2011. *Autoimmun. Rev*)

### 2.2.3 Capacidad Inmunogénica del Melanoma

El melanoma es considerado un tumor especialmente inmunogénico. Alrededor del 11% de los melanomas desaparecen espontáneamente frente al 1,8% otros tipos de tumores. De hecho la presencia de linfocitos infiltrando el tumor está relacionada con un buen pronóstico (Oble et al., 2009), (Schatten et al., 2014), (Ladányi, 2015).

Los melanomas expresan un amplio rango de antígenos asociados al tumor, favoreciendo así su reconocimiento y eliminación por parte del sistema inmune.

Los antígenos, dependiendo del origen, se clasifican en 4 grupos, a saber:

- ✓ Los denominados antígenos testiculares de cáncer: son antígenos implicados en las vías de diferenciación; están relacionados con las células *stem* o progenitoras. Los factores que influyen en su transcripción son epigenéticos, siendo común su expresión en los testículos y la placenta. En 1991 el grupo de Van der Brugger descubrió estos marcadores en el melanoma; posteriormente se asociaron a otros tipos de tumores sólidos, como el neuroblastoma, cáncer de vejiga, etc. Entre ellos se encuentran el antígeno asociado a melanocito (MAGE), el antígeno B de melanoma (BAGE) y el antígeno G (GAGE) entre otros (Bao et al., 2011).
- ✓ Antígenos relacionados con la diferenciación melanocítica: la tirosinasa, Melan A/MART-1, y las proteínas relacionadas con la tirosina (TYRP-1 y TYRP-2)..
- ✓ Proteínas mutadas específicas de tumor: la quinasa 4 (dependiente de ciclina), la  $\beta$ -catenina y la fibronectina.
- ✓ Grupo de proteínas traducidas de secuencias sintrónicas aberrantes: el antígeno asociado a melanoma mutado (MUM-1), el p15, y la N-acetilglucosaminiltransferasa.

#### 2.2.4 **Mecanismos de evasión tumoral en el melanoma**

No obstante, la progresión de los tumores está íntimamente ligada a la capacidad de evasión de las células tumorales a la respuesta inmunológica.

Las últimas evidencias demuestran que la progresión del melanoma está relacionada con un aumento de la inmunosupresión que puede ser mediada a distintos niveles:

- Regulación del sistema inmune:

Producida por el aumento de las células Tregs cuya principal función es controlar la autoinmunidad en condiciones fisiológicas. También regulan la inhibición de la respuesta T citotóxica, frente a autoantígenos tumorales (Serafini et al., 2006), (Viguier et al., 2004).

- Immunomodulación:

1.- Sobreexpresión de diferentes moléculas, como pueden ser las proteínas denominadas ligandos de muerte programada (PDL): PD-L1 y PD-L2. Los PDL son ligandos específicos de receptores transmembranales presentes en los linfocitos T, células B activadas y células mieloides (PD-1).

La unión de estos ligandos produce una cascada de reacciones cuyo efecto es la supresión de la respuesta inmune frente al tumor, dicha respuesta aumenta la tolerancia (Freeman et al., 2000).

El receptor PD-1 en los linfocitos T actúa inhibiendo la señal mediada por el receptor de células T (TCR) y disminuyendo la producción de citocinas, lo que dará lugar a la inhibición de la proliferación.

Varios estudios demuestran que existe una correlación entre la expresión de PD-L1 en el melanoma y un peor pronóstico (Hino et al., 2010).

2.- Ausencia de receptores de activación del sistema inmune, como son las moléculas CD80 y CD86 expresadas en las células presentadoras de antígeno. Y, por otro lado, la pérdida de la expresión de moléculas del Complejo Mayor de

Histocompatibilidad tipo I (MHC-I) en la superficie de las células tumorales (Chang et al., 2005), (Denfeld et al., 1995).

3.-Expresión de HLA-G soluble, se ha detectado en la periferia del melanoma un subtipo de HLA-G soluble (HLA-G5). El HLA-G puede ser reconocido por diferentes receptores: los receptores inhibidores de la función citotóxica (KIRs), el IL-T2 y el IL-T4. Estos receptores se encuentran en diferentes poblaciones celulares: células NK , linfocitos T, células dendríticas, células B y monocitos. La unión del HLA-G a estos receptores produce una disminución de la función citotóxica y, por tanto, impide la eliminación de la célula tumoral (Adrián Cabestré et al., 1999), (Rouas-Freiss et al., 2000).

4.-Expresión de Fas-ligando, esta molécula induce la apoptosis de las células del sistema inmune. Se ha observado que las células del melanoma son capaces de producir Fas-Ligando, que es secretado en forma de partículas subcelulares, las cuales pueden inducir apoptosis en los linfocitos inmunocompetentes de la periferia (Andreola et al., 2002)

5.-Ausencia de P-selectina, se ha observado ausencia de P-selectina en la microvasculatura cercana al tumor, comprometiendo el rolling y la extravasación de los leucocitos a la zona tumoral y por tanto inhibiendo así la respuesta inmune (Nooijen et al., 1998).

### **2.2.5 Inmunoterapias aprobadas en la actualidad**

El estudio de la respuesta inmune frente a *nevus* benigno o al melanoma es importante para el desarrollo de inmunoterapias. Se han

descrito que entre 20% y 30% de los melanomas presentan regresiones microscópicas (Moretti et al., 2007)

La presencia de vitiligo está asociada a un buen pronóstico en el melanoma en estadios tempranos (Quaglino et al., 2010). El vitiligo se caracteriza por ser una enfermedad autoinmune asociada a la pérdida de expresión de melanina. No obstante, en aquellos melanomas con estadios tardíos, no se puede corroborar esta correlación ya que posiblemente el tumor posea varios mecanismos de escape a la respuesta inmunológica (Speeckaert et al., 2011). Las vías de escape, como ya se han mencionado en el apartado anterior, se encuentran cada vez más claras y definidas, ayudando así a una mejoría en la evolución de las terapias inmunes.

Los mecanismos de escape tumoral se basan principalmente en evitar que los linfocitos T citotóxicos actúen sobre la célula tumoral a diferentes niveles, por lo que las inmunoterapias intentan revertir este proceso.

Las inmunoterapias actuales se pueden clasificar en varios grupos: aquellas en las que se utilizan citocinas, aquellas en las que se utilizan anticuerpos monoclonales y la terapia celular (Rotte et al., 2015).

### 2.2.5.1 ***Inmunoterapia con citocinas.***

#### 2.2.5.1.1 Interleucina 2 (IL-2)

La IL-2 fue la primera citocina utilizada como factor de crecimiento de linfocitos T, identificada en 1976 y clonada en 1983. Ha sido evaluada en el tratamiento de varios cánceres, entre ellos el melanoma.

Su utilización como terapia adyuvante se basa en estudios in vitro que demuestran que post-tratamiento con IL-2 de un cultivo de linfocitos se producía la activación de linfocitos citotóxicos, los cuales eran capaces de lisar las células tumorales.

La terapia con IL-2 fue aprobada para su uso por la FDA en 1998 por su habilidad de inducir remisiones a largo plazo en un grupo pequeño de pacientes. Su nombre comercial es el de *Proleukina* y se recomienda su uso en melanomas de Estadio IV con las siguientes características: melanomas a los que es imposible hacer cirugía debido a la localización del tumor, pero que por sus características, poseen un mejor pronóstico dentro de su grupo, o como segunda línea de terapia en tumores de peor pronóstico (Atkins et al., 1999).

Su uso debe limitarse a pacientes con un buen estado de salud general, ya que se han observado en diferentes ensayos clínicos efectos adversos que pueden llegar a ser severos como son: arritmias, hipotensión, acidosis metabólica y neurotoxicidad.

#### 2.2.5.1.2 Inmunoterapia con Interferon- $\alpha$ .

La terapia adyuvante con Interferon- $\alpha$  fue aprobada por la FDA en 1996 en melanomas de alto riesgo.

El INF- $\alpha$  define a un conjunto de citocinas pleiotrópicas con efectos antivirales e inmunomoduladores. Se ha testado en el melanoma por su capacidad de aumentar la presentación antigénica en las células dendríticas. Dentro del conjunto de proteínas incluidas en el grupo de los interferones el más utilizado como terapia adyuvante en la actualidad es el Interferón  $\alpha$ -2b. (Sylatron), (Chevolet et al., 2015), (Flaherty et al., 2014).

Los interferones (INF) son citocinas secretadas por las células en: respuesta a infecciones virales frente a inductores biológicos o sintéticos. Fueron descubiertas en los años 50, presentan tanto *in vitro* como *in vivo* un amplio espectro de actividades biológicas. Entre ellas se encuentran las funciones: antiviral, anti-linfoproliferativa e inmunomoduladora (Pestka et al., 2004).

Existen tres grupos de interferones según su estructura y función:

- ✓ Tipo I : INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\epsilon$ , INF-K e INF- $\omega$ .
- ✓ Tipo II: INF- $\gamma$
- ✓ Tipo III: INF- $\lambda$

La mayoría de los interferones utilizados como terapia son producidos mediante ingeniería genética. El INF- $\alpha$  fue la primera bioterapia aprobada y por tanto la base de las bioterapias que aparecieron a posteriori. Hasta 1978 no se consiguieron aislar los INF de forma pura y homogénea; este hecho está relacionado con la aparición de la cromatografía de alta afinidad la cual permitió su purificación en altas cantidades necesarias para mejorar los conocimientos sobre su estructura química y su actividad biológica.

Durante el proceso de purificación del INF- $\alpha$  se evidenció que no se trataba de una única proteína sino un conjunto de 13 proteínas (especies) que definían la familia de INF- $\alpha$ . Las distintas especies poseen un patrón diferente en cuanto a la activación celular.

Los IFN tipo I, entre los que se encuentra el INF- $\alpha$ , se unen a la superficie celular a través de dos tipos de receptores: INF- $\alpha$  receptor 1 y INF- $\alpha$  receptor 2. Esta unión induce una cascada de fosforilaciones secuenciales en el citoplasma que comienza por la fosforilación de

receptores asociados a tirosina quinasa (las proteínas Janus quinasa 1 (JAK 1) y la tirosinaquinasa 2), las cuales se activan. A su vez, estas proteínas activadas actúan fosforilando un grupo de factores de transcripción que se encuentran de forma latente en el citoplasma STAT1 y STAT2. Estos factores de transcripción activados se unen a la proteína p48 y forman el factor estimulador de genes dependientes de INF3 (ISGF3), que se trasloca al núcleo y se une al promotor de los genes de respuesta a INF tipo I

En la actualidad están aprobadas para la utilización en terapia anti-tumoral en humanos tres especies de INF- $\alpha$ : INF-2 $\alpha$ a, INF- $\alpha$ 2b y INF-2 $\alpha$ c. Existe una variante del INF- $\alpha$  acaba de ser aprobado por la FDA peglycated-INF- $\alpha$  se trata de INF- $\alpha$  unido a un resto de polietilenglicol que le permite una mejor absorción y una vida media más larga (Rafique et al., 2015).

Ensayos clínicos randomizados durante 30 años han establecido la alta dosis de INF- $\alpha$  como terapia adyuvante en pacientes con melanoma Estadio IIB/III; recientemente se ha aprobado el uso de peg-INF- $\alpha$  en melanoma de Estadio III.

Se han testado los diferentes dosis de INF- $\alpha$  en ensayos clínicos randomizados. Estos se clasifican: según la dosis empleada de INF- $\alpha$  (baja- media o alta), la duración de la terapia, la ruta de administración y el tipo de INF usado. Por otro lado, se clasificaron los pacientes incluidos en los ensayos clínicos de acuerdo al riesgo de recaída y mortalidad, las cuales van a permitir definir tres grupos de pacientes con bajo, medio y alto riesgo según la clasificación (Balch et al., 2009).

En los ensayos clínicos (E1684, E1690, E1694 y E2696) testados por el *Easten Cooperative Oncology Group* (ECOG) y en el

Intergupo de EEUU se ha observado que la dosis alta de INF-2 $\alpha$ b como terapia adyuvante en pacientes con Estadio IIB, III y IV post cirugía del tumor tiene impacto en la supervivencia libre de enfermedad (RFS); sin embargo no se observa en todos ellos efecto sobre la supervivencia total (OS) (Kirkwood et al., 2000), (Kirkwood et al., 2001a), (Kirkwood et al., 2001b).

El régimen de alta dosis de INF- $\alpha$  testado en estos ensayos clínicos constaba de una primera fase de inducción de 20 millones de UI/m<sup>2</sup>/d, vía intravenosa durante 5 días consecutivos en 1 mes, seguido por un período de mantenimiento de 10 millones de UI/m<sup>2</sup>/d, vía subcutánea durante 3 días a la semana en 11 meses. En todos los ensayos clínicos de fase III (E1684, E1690, E1694) se obtiene beneficios significativos en la RFS , mientras que solamente en dos de ellos se consigue beneficios en la OS.

En el ensayo clínico E1684 se incluyeron 287 pacientes clasificados entre Estadio IIB y III tratados con alta dosis de INF- $\alpha$ . La mayor parte de ellos presentaban metástasis linfáticas clínicamente evidentes. En el análisis del seguimiento a los 6,9 años se obtienen datos significativos tanto para la RFS como la OS en pacientes tratados frente al grupo control (no tratado). Un dato significativo de este ensayo fue que los pacientes que presentaban metástasis clínicamente evidentes era el grupo en el que la terapia con INF- $\alpha$  demostró un gran impacto positivo .Con los datos obtenidos en este ensayo la FDA aprobó el uso de INF- $\alpha$  como terapia adyuvante. No obstante hay que resaltar que un estudio posterior, a los 12,6 años de los pacientes incluidos en este ensayo demostró datos significativos únicamente para la RFS y no se corroboró el efecto sobre las OS

En el ensayo clínico E1690 se incluyeron 880 pacientes; en él se compara la dosis alta de interferón con la dosis baja y un grupo placebo. El seguimiento de los paciente se realizó en 4,3 años, el resultado fue una mejoría en RFS en pacientes con alta dosis de INF- $\alpha$  frente a la baja dosis y el grupo control y no hubo diferencias en OS.

Se han barajado varias hipótesis para explicar las diferencias obtenidas entre los ensayos E1684 y E1690. Una de ellas es que la evolución en los métodos de cirugía y un correcto estudio de los diferentes estadios de los pacientes reportan una mayor supervivencia en el grupo control en el segundo ensayo clínico. Por otro lado en el E1690 los pacientes que mostraron recurrencia en el grupo control eran rescatados con el tratamiento con INF- $\alpha$ .

En el ensayo clínico E1694 se incluyeron un total de 642 pacientes; en ellos se compara el uso de la alta dosis de INF- $\alpha$  frente una vacuna de gangliósidos experimental que induce anticuerpos contra el gangliósido GM2. Esta vacuna es capaz de producir respuesta inmune específica contra células de melanoma. Se incluyeron pacientes con Estadios IIB/III de melanoma post- cirugía. El resultado obtenido fue una mejor RFS y OS en favor del INF- $\alpha$  .El efecto fue superior en los pacientes con ganglios negativos. El estudio hubo de ser detenido por la evidente superioridad del brazo del INF- $\alpha$  e incluso se llegó a especular que la vacuna poseía un efecto perjudicial ya que se comportaba peor que el grupo placebo.

En el ensayo clínico E2696 en el que se incluyeron 107 pacientes con melanoma con Estadios IIB, III, y IV, se evaluó la producción de anticuerpos anti-GM2 en presencia de la vacuna GMK y en presencia o ausencia de INF- $\alpha$ . Se compararon tres brazos:

- Brazo A: vacuna GMK y al mismo tiempo alta dosis de INF- $\alpha$
- Brazo B: vacuna GMK y posteriormente alta dosis de INF- $\alpha$
- Brazo C: vacuna GMK

El resultado de este ensayo fue que la combinación de las terapias arriba descritas mejora RFS frente al uso de la vacuna GMK sola. No hubo diferencias en la OS.

En el ensayo clínico E18991 realizado en Europa se utiliza el peg-INF en busca de la eficacia y seguridad. El peg-INF se administra subcutáneamente en una primera fase de inducción de 6 $\mu$ g/kg por semana durante 8 semanas, seguido de un período de mantenimiento con inyecciones subcutáneas de 3 $\mu$ g/kg durante 5 años. El seguimiento de los pacientes alcanzó una media de 7,6 años, demostrando una mejora en RFS en el brazo tratado, pero no hubo diferencias en la OS (Eggermont et al., 2012).

## **2.2.5.2 *Inmunoterapia con anticuerpos monoclonales***

### **2.2.5.2.1 Ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4)**

El ipilimumab es un anticuerpo monoclonal que fue aprobado por la FDA en 2011 para el uso en melanomas de alto riesgo. Este anticuerpo monoclonal se une específicamente al CTLA-4, receptor que se encuentra en los linfocitos T. Los linfocitos T comienzan a expresar CTLA-4 después de ser activados específicamente por las células dendríticas a través de su TCR y la molécula coestimuladora CD28. La principal función del CTLA-4 es regular o controlar la respuesta inmune e impedir que esta no sea exacerbada. Por lo tanto el uso de ipilimumab como inmunoterapia se basa en el hecho de que la inhibición del CTLA-4 va a potenciar la respuesta inmune mediada por

los linfocitos T y, por tanto, una posible regresión del tumor (Eggermont et al., 2015).

#### 2.2.5.2.2 Nivolumab y Pembrolizumab ( Anticuerpos anti-PD1 y anti-PD-L-1)

Nuevas terapias están surgiendo en los últimos años debido al conocimiento de la progresión de la enfermedad y los mecanismos de escape tumoral. La expresión de PD-L1 en las células de melanoma es un biomarcador para la utilización de las terapias anti-PD-1. En ensayos clínicos fase I con anticuerpos Nivolumab y Pembrolizumab se ha observado un 30% de respuesta (Topalian et al., 2012), (Robert et al., 2014), (Topalian et al., 2014).

#### 2.2.5.2.3 Inmunoterapias combinadas

La combinación de ipilimumab y nivolumab en estudios realizados entre los años 2013 y 2014 han reportado resultados prometedores sobre la eficacia del tratamiento , así el grupo de Snolz ha publicado resultados con el 80% de supervivencia en dos años en pacientes con melanoma de avanzado. La combinación de estas dos terapias tiene como objetivo la disminución de la inmunosupresión mediada por el tumor actuando en diferentes niveles ipilimumab restaurando la activación y proliferación de los linfocitos T y el nivolumab que previene la neutralización de los Linfocitos T y de las células dendríticas plasmocitoides cercanas al tumor ( Larkin et al., 2015), (Cohen and Sznol, 2015)

Otras vías de estudio de activación del sistema inmune como la activación de células dendríticas capaces de presentar anticuerpos procedentes del melanoma se están realizando, aunque aún no han sido aprobadas por la FDA.

### **2.2.6 Efectos adversos asociados a la inmunoterapia (INF- $\alpha$ )**

Se observan efectos adversos en un 60% de los pacientes sometidos a inmunoterapia con INF- $\alpha$ . Los eventos más comunes reportados en los ensayos clínicos mencionados en el capítulo anterior están asociados a: problemas gastrointestinales (náusea, diarrea y colitis), problemas hepáticos, dermatitis en el lugar de inyección de la terapia, fatiga y anorexia.

Centrándonos en el tratamiento con INF- $\alpha$ 2b a alta dosis se han descrito los siguientes efectos adversos (Hauschild et al., 2008):

- Aparición de síntomas febriles que pueden ser agudos y durar hasta 12 horas después de la administración de las primeras dosis, aunque durante el tratamiento se genera tolerancia.
- Hepatotoxicidad determinada por la elevación moderada de las enzimas hepáticas en ausencia de síntomas clínicos. Estos valores deben de ser vigilados estrictamente porque se ha asociado fallo hepático en pacientes tratados con esta inmunoterapia. Siendo aconsejable realizar un ajuste de dosis en aquellos pacientes en los que el aumento sea considerable. Este hecho hace que el tratamiento con INF- $\alpha$ 2b no sea aconsejable en el caso de pacientes con hepatitis.
- La fatiga es el efecto adverso más común asociado a la terapia INF- $\alpha$ 2b. Se ve aumentada según avanza el tratamiento y se cree que puede deberse a una desregulación endocrina, neurológica o autoinmune. La fatiga es el factor más importante en la baja calidad de vida de estos pacientes durante el tratamiento.

- La anorexia está asociada a pacientes sometidos a esta terapia. A estos pacientes se les asocia pérdida de peso y debe realizarse en el entorno familiar una reeducación alimenticia que conste en comer poco, pero frecuentemente y utilizar suplementos hiperproteicos.
- Los síntomas neuro-psiquiátricos, como la irritabilidad y la depresión, son comunes en este tratamiento, así como el estado confusional agudo, apatía, problemas del sueño, temor, disfunción sexual, problemas de memoria, síntomas maniáticos, disfunción cognitiva e ideas suicidas.

### **2.2.7 Citometría de Flujo aplicada al estudio del sistema inmunitario en sangre periférica**

La citometría de flujo (CMF) permite la medida simultánea de emisiones de fluorescencia y dispersión de luz inducidas por la iluminación adecuada de células o partículas microscópicas en suspensión, a medida que éstas fluyen de una en una a través de un compartimento de detección (O'Connor et al., 2001),(Herrera et al., 2007). De esta forma, la CMF es una poderosa metodología citómica que permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos en la misma célula a una velocidad de adquisición de datos que alcanza los miles de eventos por segundo. La CMF se ha convertido en una de las tecnologías analíticas de fluorescencia más avanzadas y que ha evolucionado rápidamente en estos últimos años. Los principales aspectos ventajosos de la CMF se pueden resumir en los siguientes conceptos:

Adquisición multiparamétrica de datos: la mayoría de los procedimientos bioquímicos clásicos y moleculares determinan un sólo

parámetro biológico por ensayo y, en general, no son suficientemente sensibles para detectar una sola célula. Los citómetros de flujo modernos permiten recoger simultáneamente en cada célula o partícula 2-3 señales de dispersión de luz (relacionadas con la morfología celular) y entre 3-10 señales de fluorescencia. De esta forma, uno o más parámetros pueden usarse para definir y acotar la subpoblación de interés en un citoma heterogéneo, y el resto de señales disponibles son asignadas al análisis de estructuras específicas o funciones en la población seleccionada.

Análisis multivariado de datos: la configuración de los citómetros modernos permite asociar la adquisición multiparamétrica de datos al análisis multivariado. Por ello, una población celular no es descrita por la mera enumeración de sus propiedades, sino por su correlación sobre cada célula individual, incrementando así su poder de discriminación. Además, los resultados generados en forma de matrices numéricas permiten definir nuevas correlaciones internas, modificar la selección de subpoblaciones y correlacionar los datos con otros descriptores biológicos, evaluando el carácter predictivo de la CMF.

Análisis veloz de elevado número de células: la elevada velocidad de adquisición de datos y la posibilidad de examinar millones de células individuales en poco tiempo permiten la detección y análisis preciso de células infrecuentes (hasta 1 evento/ $10^8$  células).

Carácter no invasivo: en la mayoría de aplicaciones, las técnicas citómicas no invaden la integridad celular, por lo que las poblaciones celulares examinadas pueden encontrarse en condiciones casi-fisiológicas en el momento de su análisis.

Fácil accesibilidad a poblaciones celulares de relevancia: el escaso volumen de muestras celulares en suspensión y el pequeño contenido en biomasa total requerido para la mayoría de los estudios citométricos facilitan el acceso a poblaciones celulares extraídas del donante humano o del animal (análisis *ex vivo*). De esta forma, la CMF se puede aplicar a la monitorización fenotípica de los efectos de fármacos y xenobióticos sobre el organismo entero, proporcionando múltiples biomarcadores de exposición y de efecto.

Elevado nivel de información biológica: la CMF produce una gran cantidad y calidad de información biológica. La información primaria, generada de forma directa por el uso de una técnica citómica concreta se potencia por la información secundaria generada por la interacción simultánea o secuencial de distintas aproximaciones citómicas las cuales que poseen un similar fundamento biológico pero generan información complementaria.

Todas estas características hacen de la CMF un método eficaz y útil para estudiar las distintas poblaciones del sistema inmune presentes tanto en médula ósea, sangre periférica, ganglio, bazo, timo...La caracterización inmunofenotípica de las células del sistema inmunológico, mediante CMF ha permitido estudiar los diferentes mecanismos implicados en la patología de la autoinmunidad y en las inmunodeficiencias.

En la actualidad, la evolución de la CMF, capaz de realizar análisis multiparamétricos, la aparición de nuevas sondas fluorescentes y el aumento de anticuerpos monoclonales hacen que esta metodología sea utilizada para el diagnóstico de las enfermedades asociadas al sistema inmune.

## Introducción

La CMF es un método eficaz en el diagnóstico de enfermedades del sistema inmune, ya que esas poblaciones presenten un inmunofenotipo específico que será diferente en cada estadio madurativo, y, por otro lado, existen cambios en los procesos de activación de la respuesta inmune.

La inmunoterapia con INF- $\alpha$ 2b produce una serie de cambios en el sistema inmune. En pacientes con melanoma este cambio se ve reflejado en la sangre periférica, especialmente en las poblaciones de células dendríticas y células Tregs (Chevolet et al., 2015),(Ascierto et al., 2010).



### **3 HIPÓTESIS**

El efecto de la inmunoterapia está estrechamente relacionado con el sistema inmunitario del paciente, su habilidad para generar una activación celular y hacer frente a las células tumorales.

La inmunoterapia realizada con citocinas, en concreto con INF- $\alpha$ 2b a alta dosis, ha sido estudiada en numerosos ensayos clínicos, en los que se ha demostrado su eficacia en la supervivencia libre de enfermedad; pocas investigaciones han estudiado de forma exhaustiva los cambios en las poblaciones leucocitarias en sangre periférica y su impacto en la eficacia del tratamiento, durante la evolución del mismo, para saber si existe un factor precoz que nos permita discernir entre aquellos pacientes en los que realmente el tratamiento está siendo eficaz, ya que, como se ha podido observar, los pacientes sufren diferentes efectos adversos que podrían eliminarse sabiendo que en ellos no es eficaz el tratamiento.



## 4 OBJETIVOS

Los principales objetivos de este trabajo son:

1. Determinar en un grupo de pacientes con melanoma la concentración en sangre periférica de un conjunto de poblaciones celulares relacionadas con la respuesta inmunitaria, incluyendo leucocitos totales, células NK, linfocitos B, subpoblaciones funcionales de linfocitos T (Tc, Th1, Th2, Treg) y subpoblaciones funcionales y marcadores de activación de células dendríticas (mieloides y plasmocitoides).
2. Determinar los efectos del tratamiento con Interferón- $\alpha$  sobre la concentración en sangre periférica de las distintas subpoblaciones de células inmunitarias analizadas y compararlos entre diferentes subgrupos de pacientes con melanoma estratificados según su estadio, presencia o ausencia de ulceración, presencia o ausencia de respuesta inmunitaria reactiva y presencia o ausencia de recidiva.
3. Aplicar un método de análisis multivariante basado en interdependencia de variables para integrar los resultados y detectar grupos de pacientes con diferente respuesta al tratamiento



## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Material

En este estudio se han incluido 5 muestras de individuos sanos y 25 pacientes procedentes del Instituto Valenciano de Oncología, diagnosticados *de novo* como melanomas de alto grado y sometidos a terapia adyuvante con INF- $\alpha$ 2b. La inclusión en este estudio se realizó previo consentimiento informado durante el periodo de reclutamiento de un año (2010-2011). En este estudio se les realizó el seguimiento hasta los 6 meses de tratamiento (180 días).

Los 25 pacientes se diagnosticaron de acuerdo a la clasificación TNM (tabla 1b):

- Estadio II: 4 pacientes 3 de ellos presentaban un estadio IIB y 1 con estadio IIC.
  - ESTADIO IIB pT3b N0 M0
  - ESTADIO IIB pT3b N0 M0
  - ESTADIO IIB pT4b N0 M0
  - ESTADIO IIC pT4b N0 M0
- Estadio III: 17 pacientes 4 de ellos con estadio IIIA, 6 estadio IIIB y 7 estadio IIIC.
  - ESTADIO IIIA pT1a N1a M0
  - ESTADIO IIIA pT2b N1a M0
  - ESTADIO IIIA pT2b N1a M0
  - ESTADIO IIIA pT4a N1a M0
  - ESTADIO IIIB pT3b N1a M0
  - ESTADIO IIIB pT3a N2 M0
  - ESTADIO IIIB pT4a N2 M0

### Material y Métodos

- ESTADIO IIIC pT2b N2b M0
- ESTADIO IIIC pT3a N3 M0
- ESTADIO IIIC pT4b N1b M0
- ESTADIO IIIC pT4a N3 M0
- ESTADIO IIIC pT4b N3 M0
- ESTADIO IIIC pT4b N3 M0
- ESTADIO IIIC pT4b N2 M0
- ESTADIO IIIC pT4b N3 M0
- Estadio IV : 4 pacientes.
  - ESTADIO IV M1a (cutánea)
  - ESTADIO IV M1b (pulmonar)
  - ESTADIO IV M1b (pulmonar y cutánea reseca).
  - ESTADIO IV M1c (intestinal)

El tratamiento llevado a cabo fue el aprobado por la FDA para alta dosis de INF- $\alpha$ 2b que consta de dos fases:

- Inducción: duración de 1 mes con dosis de  $20 \times 10^6$  unidades/m<sup>2</sup> 5 días a la semana consecutivos, vía intravenosa.
- Mantenimiento: duración de 11 meses con  $10 \times 10^6$  unidades/m<sup>2</sup>, vía subcutánea, 3 veces a la semana en días alternos.

Durante el tratamiento se midieron las enzimas hepáticas con el fin de evaluar la hepatotoxicidad mediada por el tratamiento. En un 48% de los pacientes se les reajustó la dosis debido a un aumento de las enzimas hepáticas. En concreto, al 24% (6 casos) se les reajustó al 75% de la dosis establecida y al otro 24% (6 casos) se les reajustó al 50%.

Los pacientes incluidos en este estudio tenían una edad media de 52,1 años  $\pm$  12 meses con un rango entre 18-69 años y una distribución entre hombres del 56% (con una media de edad es 54) y 44% (con una media de edad 49).

## 5.2 Métodos

Se diseñaron dos paneles de anticuerpos monoclonales en los que se utilizaron 6 fluorescencias diferentes para poder distinguir las poblaciones de interés. Además se tuvieron en cuenta los diferentes espectros de emisión de las fluorescencias para evitar solapamientos entre ellas que podían dificultar la caracterización fenotípica de las poblaciones:

### 5.2.1 Poblaciones linfocitarias.

Para la identificación de las diferentes poblaciones linfocitarias se utilizaron los siguiente anticuerpos monoclonales:

- **CD45:** anticuerpo que identifica un antígeno pan-leucocitario, expresado con diferente intensidad en las diferentes subpoblaciones leucocitarias. Así los linfocitos tienen mayor expresión, seguida de los monocitos y con menor expresión, los neutrófilos
- **CD3:** anticuerpo que identifica un antígeno presente en las células T. Actúa como co-receptor en la traducción de señales mediadas por el TCR.
- **CD4:** anticuerpo que identifica dos poblaciones diferentes: monocitos y una subpoblación de linfocitos T. En el caso de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> se encuentra implicada en la maduración tímica y en su activación vía complejo mayor de Histocompatibilidad tipo II. Las células T que poseen el CD4<sup>+</sup> son células T *helper*.
- **Anti-CRTH2:** receptor de la prostaglandina D2. Identifica una subpoblación de células T *helper*. Las células que poseen este receptor tienen un patrón de producción de citocinas que van a

### Material y Métodos

favorecer la respuesta mediada por linfocitos B, correspondiendo con los linfocitos Th2 (Cosmi et al., 2001).

- **CD25:** es un anticuerpo que identifica el receptor de baja afinidad de la IL-2. Se encuentra presente en los linfocitos T activados y de forma constitutiva en los linfocitos Treg.
- **CD127:** es un anticuerpo que identifica el receptor de la Interleucina-7, implicada en la diferenciación de los linfocitos T. Este receptor mantiene su expresión durante todos los estadios madurativos de los linfocitos T; no obstante, las células Treg que se caracterizan por ser CD127 negativas. (Banham, 2006)
- **CD8:** anticuerpo que identifica un co-receptor presente en diferentes poblaciones celulares, como son los linfocitos T $\alpha\beta$  CD8, T $\gamma\delta$  y NK. Es una molécula implicada en dos de las principales funciones en los linfocitos T: la maduración tímica y la activación mediada por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I. Los linfocitos T que lo poseen reciben el nombre de linfocitos T citotóxicos.
- **CD56:** es un anticuerpo que reconoce el antígeno NCAM que se encuentra en la superficie tanto de células leucocitarias (células NK), como en células del sistema nervioso (neuronas y glía). Su principal función es la unión célula-célula.
- **CD19:** es un anticuerpo que identifica a un co-receptor de las células B. Su principal función es regular la activación celular producida por el receptor específico de la célula B (BCR).

Estos anticuerpos monoclonales fueron distribuidos en dos paneles, cada uno correspondiente a un tubo, como se describe a continuación:

- **Tubo 1:** panel de anticuerpos monoclonales utilizado para la identificación de las siguientes poblaciones: leucocitos y las subpoblaciones de linfocitos T como son los linfocitos T *helper* (Th1 y Th2) y los linfocitos T citotóxicos:

**CD3-FITC/CRTH2-PE/CD45-ECD/CD25-PC5/CD8-PC7/CD4-APC**

- **Tubo 2:** se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales con cuya combinación se poblaciones de linfocitos T, B y NK y la subpoblación de células Treg:

**CD3-FITC/CD127-PE/CD45-ECD/CD25-PC5/CD56-PC7/CD(4+19)-APC.**

### 5.2.2 **Identificación de las poblaciones de células dendríticas mieloide y plasmocitoide.**

Para la identificación de las diferentes poblaciones de células dendríticas se utilizaron los siguiente anticuerpos monoclonales :

- **CD14:** anticuerpo que identifica el TLR-4, receptor específico del lipopolisacárido. Se encuentra en la membrana de monocitos y sus derivados, como son los macrófagos y células dendríticas derivadas.
- **CD16:** anticuerpo que reconoce el FcγRIII receptor de baja afinidad de la región FC de las inmunoglobulinas. Actúa en las funciones de citotoxicidad y fagocitosis dependientes de anticuerpos. Se encuentra presente en las células NK, neutrófilos, monocitos y macrófagos.
- **CD33:** anticuerpo que reconoce el receptor transmembranal *Siglec-3*. Se encuentra presente en las células de estirpe mieloide y su principal función es inhibir la actividad celular.
- **CD123:** anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor de la IL-3 presente principalmente en las células dendríticas y basófilos. Su

principal función es la diferenciación y activación de múltiples células del sistema inmune.

- **Anti-ILT-3:** anticuerpo que identifica una molécula de la superfamilia de la inmunoglobulinas, expresada principalmente en células de origen mieloide y en células dendríticas. Se ha asociado una sobreexpresión de este marcador con células dendríticas tolerogénicas (Suciu-Foca et al., 2005).

Se utilizó el kit comercial de *Beckman Coulter* para la identificación de las células dendríticas. Está formado por dos paneles de anticuerpos los cuales corresponden a dos tubos diferentes:

- **Tubo 3:** utilizado para la identificación de células dendríticas mieloides (MDC): **CD(14+16)-FITC /ILT-3-PE /CD33-PC5**
- **Tubo 4:** utilizado para la identificación de células dendríticas plasmocitoides (PDC): **CD(14+16)-FITC /ILT-3-PE /CD123-PC5**

### 5.2.3 Toma de muestras:

En cada punto, en el tiempo de estudio (0, 30, 90 y 180 días), se extrajeron a cada paciente 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA. Las muestras de sangre obtenidas fueron transportadas inmediatamente al Servicio de Citometría de la Universidad de Medicina y Odontología de Valencia, donde fueron procesadas a su recepción, manteniéndose en todo momento a temperatura ambiente.

### 5.2.4 Preparación de las muestras:

1.-Para realizar el estudio, se rotularon 4 tubos, siguiendo el siguiente esquema:

## Material y Métodos

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Tubo 1</b> | CD3-FITC/CRTH2-PE/CD45-ECD/CD25-PC5/CD8-PC7/CD4-APC       |
| <b>Tubo 2</b> | CD3-FITC/CD127-PE/CD45-ECD/CD25-PC5/CD56-PC7/CD(4+19)-APC |
| <b>Tubo 3</b> | CD(14+16)-FITC /ILT-3-PE /CD33-PC5                        |
| <b>Tubo 4</b> | CD(14+16)-FITC /ILT-3-PE /CD123-PC5                       |

2.-Se añadió 100µl de sangre a cada tubo y, acto seguido, se añadieron los anticuerpos monoclonales según se indica en la siguiente tabla.

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Tubo 1</b> | 10µl CD3 FITC + 10µl CRTH2 PE +10µl CD45 ECD +10µl CD25 PC5 +10µl CD8 PC7 +10µl CD4 APC       |
| <b>Tubo 2</b> | 10µl CD3 FITC + 10µl CD127 PE +10µl CD45 ECD +10µl CD25 PC5 +10µl CD56 PC7 +10µl CD(4+19) APC |
| <b>Tubo 3</b> | 20µl vial MDC (CD(14+16)-FITC /ILT-3-PE /CD33-PC5)  |
| <b>Tubo 4</b> | 20µl vial PDC CD(14+16)-FITC /ILT-3-PE /CD123-PC5   |

3.-Se incubaron 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad

4.-La lisis y fijación de las muestras fueron procesadas en el aparato *TQ-Prep Coulter*.

5.-Una vez fijadas las muestras, se añadieron 100µl de las esferas Flow Count mediante pipeteo inverso que previamente fueron homogeneizadas para poder realizar un recuento absoluto de las poblaciones de estudio.

### **5.2.5 Adquisición de datos por citometría de flujo:**

Una vez procesadas las muestras, sin superar la hora después de añadir las esferas, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo *Gallios (Beckman Coulter)*, equipado con tres láseres diodos:

### Material y Métodos

- Un láser azul que emite luz a una longitud de onda de 488nm.
- Un láser rojo que emite luz a una longitud de onda de a 635nm
- Un láser violeta que emite luz a una longitud de onda de a 405nm.

En este estudio se utilizaron únicamente el laser azul y el rojo.

Las muestras fueron adquiridas en el programa *Gallios* y se utilizaron paneles específicos de adquisición diseñados para cada tubo :

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>Tubo 1 -2</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ <b>Láser azul:</b> 5 fluorescencias ( FITC, PE, ECD, PC5, PC7) utilizando los canales (FL1, FL2, FL3, FL4 y FL5) respectivamente</li><li>✓ <b>Láser rojo:</b> 1 fluorescencia( APC) canal FL6</li></ul> |
| <b>Tubo 3-4</b>  | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ <b>Láser azul:</b> 3 fluorescencias( FITC, PE, PC5) utilizando los canales ( FL1,FL2, FL4) respectivamente</li></ul>  |

Se adquirieron un total de 300.000 eventos para poder distinguir aquellas poblaciones menos comunes dentro de los leucocitos, como son las Treg, Th2 y las dos poblaciones de células dendríticas.

Durante la adquisición en el protocolo se crea una *gate* (ventana de análisis) denominado Flow Count, al que se le va a asociar el número de esferas por  $\mu\text{l}$  que viene indicado en cada vial de dichas esferas.

### 5.3 **Análisis de datos:**

Los datos citométricos fueron generados y almacenados en forma de ficheros de modo lista con formato FCS 3.0 con el programa informático Gallios, propio del citómetro de flujo. Para el análisis

posterior, los ficheros FCS 3.0 fueron procesados con el programa y analizados con el mismo software Gallios.

El análisis de cada tubo se realizó siguiendo las siguientes pautas:

**Tubo 1.** En este tubo se identificó la población de células leucocitarias mediante la expresión del marcador CD45. Posteriormente se identificaron los linfocitos, como aquella población que presentaba más expresión de CD45<sup>+</sup> y menos granularidad (SSC). Se realizó un *gate* en linfocitos, y, sobre ella, identificaron los linfocitos T como aquellos que presentaban CD3<sup>+</sup>. Sobre estos se realizó otro *gate* en el que también se identificaron las poblaciones de linfocitos TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>. Posteriormente se realiza un *gate* en TCD4<sup>+</sup> y se analizaron dos poblaciones : CRTH2<sup>+</sup> como la población de linfocitos Th2 y CRTH2<sup>-</sup> como la población de linfocitos Th1 (Figura 4)

**Tubo 2.** En este tubo se identificó la población de células leucocitarias mediante la expresión del marcador CD45. Posteriormente se identificaron los linfocitos como aquella población que presentaba más expresión de CD45 y menos granularidad (SSC). Se realizó un *gate* en linfocitos y se identificaron los linfocitos T como aquellos que presentaban CD3<sup>+</sup>. Sobre estos se realizó otro *gate* y del mismo modo se identificó la población de linfocitos TCD4<sup>+</sup>. Sobre ésta población se analizó la ausencia de CD127 y la presencia de CD25 para caracterizar las células Treg. Por otro lado, se analiza dentro de linfocitos negativos para CD3 la expresión de CD19 para identificar las células B y la expresión del marcador CD56 para identificar las NK. (Figura 5).

**Tubo 3 y 4.** En ambos tubos se identificaron las de células mononucleadas mediante los parámetros de complejidad y granularidad

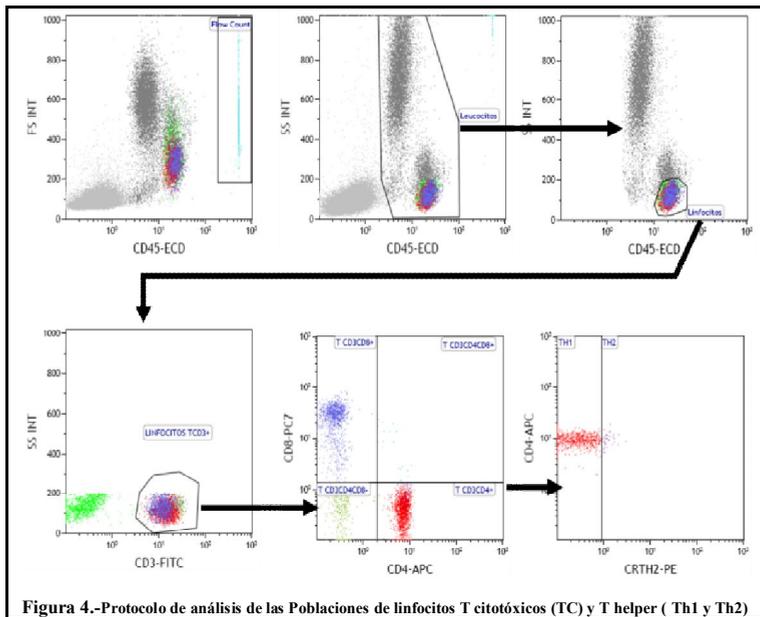
### Material y Métodos

proporcionados por el citómetro de flujo. De esta población se seleccionaron las células CD14 y CD16 negativas y, a partir de esta población, en el tubo 3 se identificaron las células dendríticas mieloides por la coexpresión de IL-T3 y CD33 y en el tubo 4 se identificaron las células plasmocitoides mediante la coexpresión de IL-T3 y CD123. (Figura 6).

De todas las poblaciones estudiadas se obtuvo el porcentaje y el número absoluto de células. Este es calculado por el propio software de adquisición cuando se le introduce el número de esferas por  $\mu\text{l}$  (Flow count) al *gate* asociado a las esferas de recuento.

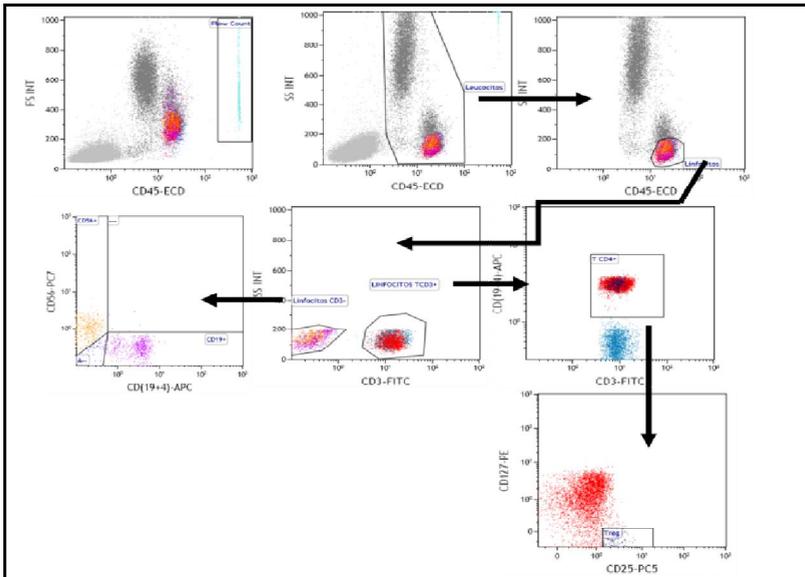
Una de las principales características de la CMF es que las células o partículas pasan enfrente del láser de una en una, por lo que, sabiendo la concentración de una de las poblaciones estudiadas, en nuestro caso las esferas de recuento, se puede extrapolar la concentración al resto de las poblaciones estudiadas.

## Material y Métodos

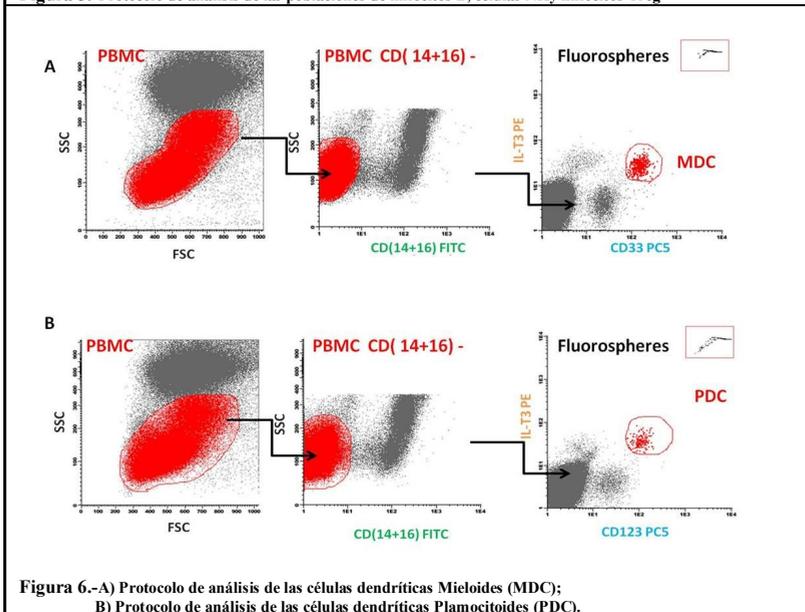


**Figura 4.-**Protocolo de análisis de las Poblaciones de linfocitos T citotóxicos (TC) y T helper (Th1 y Th2)

Material y Métodos



**Figura 5.-**Protocolo de análisis de las poblaciones de linfocitos B, células NK y linfocitos Treg



**Figura 6.-**A) Protocolo de análisis de las células dendríticas Mieloides (MDC);  
B) Protocolo de análisis de las células dendríticas Plasmocitoides (PDC).

#### 5.4 **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, tanto de la parte clínica de los pacientes como los obtenidos en la CMF según los procedimientos descritos, fueron exportados dichos resultados al programa de análisis estadístico *SPSS13.0* (*SPSS Inc., IBM Company*). La significación estadística de las diferencias entre muestras se determinó mediante la prueba T de Student. Se consideró un nivel de significación estadística cuando el valor de  $p \leq 0.05$ ).



## **6 RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

El objetivo fundamental del presente estudio es el de caracterizar la respuesta inmunitaria en pacientes con melanoma y evaluar los efectos sobre la misma del tratamiento con Interferón  $\alpha 2b$ . La primera parte del trabajo tuvo como objetivo el estudio de la función inmunitaria en pacientes con melanoma antes de ser sometidos al tratamiento, aplicando la citometría de flujo multiparamétrica a la caracterización comparativa de las poblaciones leucocitarias y de las principales subpoblaciones de linfocitos y de células dendríticas. Para ello se compararon un grupo control, formado por cinco individuos sanos y un grupo de 25 pacientes con melanoma maligno en distintos estadios. En estos grupos, la aplicación de la citometría de flujo multiparamétrica ha permitido determinar en muestras de sangre periférica la concentración de tipos celulares de gran relevancia en la respuesta inmunitaria, como son leucocitos totales, linfocitos, linfocitos T (incluyendo linfocitos Th, Tc y Treg), linfocitos B y células NK, además de las dos poblaciones principales de células dendríticas (DC) circulantes, las plasmocitoides (PDC) y las mieloides (MDC). En ambas poblaciones de DC, se cuantificó además la expresión de moléculas de relevancia reguladora, como CD33, CD123 e ILT-3.

Tras determinar mediante citometría de flujo los valores absolutos y las distribuciones de los tipos celulares de interés en ambas cohortes de individuos, se pudo abordar un estudio más profundo en el grupo de pacientes, evaluando los cambios en la respuesta inmunitaria que pudieran estar asociados con la progresión de la enfermedad. Para ello, se compararon los valores observados en pacientes que, al

diagnóstico, presentaban melanoma en diferentes estadios (estadios II a IV).

Una vez caracterizado el estatus de sus poblaciones inmunitarias de sangre periférica, los 25 pacientes incluidos en este estudio fueron tratados con Interferón  $\alpha$ , de acuerdo con el régimen descrito en el apartado de Metodología. Brevemente, el tratamiento comprendió dos etapas. En la fase de inducción (30 días) los pacientes recibieron 5 dosis semanales de 20 millones de unidades/m<sup>2</sup> de Interferón- $\alpha$ 2b por vía intravenosa. En la fase de mantenimiento (5 meses) los pacientes fueron tratados con 3 dosis semanales de 10 millones de unidades/m<sup>2</sup> de Interferón  $\alpha$  por vía subcutánea. A lo largo de este período se obtuvieron muestras de sangre periférica y se procedió al estudio de células inmunitarias, como se ha descrito, incluyendo un nuevo grupo de 5 individuos sanos de control.

Al igual que en el estudio basal, la disponibilidad de datos citométricos en los pacientes sometidos a tratamiento, permitió un análisis más detallado, mediante el cual se evaluó el efecto inmunitario del tratamiento en diferentes subgrupos de pacientes. Así, se pudo estudiar de forma específica los efectos inmunitarios inducidos por el tratamiento en los pacientes estratificados por: a) su estadio al diagnóstico; b) presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario; c) presencia o ausencia de recidiva (únicamente en la fase de inducción) y d) presencia o ausencia de respuesta inmunitaria reactiva (vitiligo y/o anticuerpos autoinmunitarios ( antitiroideos y/o antimitocondriales)).

El conjunto de estudios laboratoriales de este trabajo, ha generado una elevada cantidad de datos de relevancia inmunitaria, cuya correlación individual con los parámetros descriptivos del estado clínico

de los pacientes y con los factores pronósticos de relevancia podría resultar compleja e, incluso, poco informativa. Para determinar el valor pronóstico de los datos inmunológicos obtenidos y, eventualmente, detectar la presencia de subgrupos de pacientes se ha aplicado una estrategia típica de la bioinformática, como es el análisis de *clústers* jerárquicos. Esta es una herramienta exploratoria que pone de manifiesto las agrupaciones (*clústers*) que, de otra forma, no serían evidentes dentro de un conjunto numeroso de datos, como es el conjunto de nuestros valores inmunológicos, clínicos e histológicos. El análisis de *clústers* jerárquicos es la forma más útil cuando se desea agrupar un conjunto de centenares de objetos. Los objetos pueden ser casos o variables, dependiendo de si se desea examinar relaciones entre variables (en nuestro contexto, evaluar el valor pronóstico de los parámetros inmunológicos) o, por el contrario, clasificar casos (para nuestro estudio, identificar pacientes con distinto pronóstico o respuesta).

## **6.1 Estudio comparativo de las poblaciones leucocitarias y las subpoblaciones linfocitarias y de células dendríticas en individuos sanos y pacientes con melanoma antes de tratamiento.**

### **6.1.1 Estudio comparativo entre individuos sanos y pacientes con melanoma.**

En la primera parte del trabajo se ha cuantificado mediante inmunofenotipado por citometría de flujo el número absoluto de leucocitos totales, linfocitos, linfocitos T (incluyendo linfocitos Th, Tc y Treg), linfocitos B y células NK, además de las células dendríticas plasmocitoides y mieloides en muestras de sangre periférica. En ambas poblaciones de DC, se cuantificó además la expresión de moléculas relacionadas con la capacidad de las DC de activar (CD33 y CD123) o inhibir (ILT-3) la respuesta mediada por linfocitos T.

Los resultados de la comparación de la muestra basal, obtenida en pacientes con melanoma al diagnóstico, con respecto a la sangre periférica de individuos normales, se muestran en la Tabla 2. Con respecto a los sujetos normales, los pacientes con melanoma presentan un mayor número absoluto de leucocitos totales, aunque este aumento no resulta significativo, dada la dispersión observada. El mismo tipo de tendencia no significativa al aumento, se observa para los linfocitos totales, los linfocitos T y las células NK. Por el contrario, sí alcanzaron significación estadística los importantes cambios observados en las subpoblaciones de linfocitos Th2 y de linfocitos Treg, que en ambos casos casi triplican la concentración en sangre periférica de individuos sanos. No se observaron cambios significativos en el resto de tipos

celulares o marcadores fenotípicos (CD33, CD123 e ILT-3) determinados.

**6.1.2 Estudio comparativo en pacientes con melanoma en diferentes estadios.**

El grupo de pacientes estudiado incluía pacientes con distinto estadio de melanoma, exceptuando el Estadio I. El subgrupo más numeroso es el de pacientes en Estadio III (17 pacientes) y se cuentan 4 pacientes en cada uno de los Estadios II y IV. Al estratificar los pacientes de melanoma según su estratificación (Tabla 3), se observan de forma más clara alguno de los cambios descritos en la Tabla 2 y aparecen nuevas variaciones de interés. En general, los cambios más marcados con respecto a los valores de control son más significativos en los Estadios II y III. En dichos estadios es mayor la tendencia al aumento del número de leucocitos y de células NK y a la disminución reversible de los linfocitos B, que tienden a recuperarse en los pacientes del Estadio IV. De nuevo, los cambios de mayor significación estadística se producen en las subpoblaciones de linfocitos Th2, cuyo importante aumento es progresivo desde el Estadio II al IV, y en los linfocitos Treg, aumentados ya desde el Estadio II, al igual que las células dendríticas mieloides, que se encuentran aumentadas en todos los estadios y muestran, además, una disminución reversible de la expresión de la molécula CD33 en los Estadios II y III.

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 2. VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (GRUPOS TOTALES)</b>                                  |                      |                       |
|---|----------------------|-----------------------|
| <b>Media <math>\pm</math> Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b>   |                      |                       |
|   | <b>Grupo Control</b> | <b>Grupo Melanoma</b> |
| <b>Leucocitos</b>   | 5937 $\pm$ 2998      | 7319 $\pm$ 1900       |
| <b>Linfocitos</b>   | 1723 $\pm$ 1111      | 2420 $\pm$ 1300       |
| <b>Linfocitos T</b>   | 1569 $\pm$ 490       | 1576 $\pm$ 875        |
| <b>Linfocitos B</b>   | 319,59 $\pm$ 171,52  | 312,9 $\pm$ 298,27    |
| <b>Células NK</b>   | 176,21 $\pm$ 111,58  | 302,95 $\pm$ 248,37   |
| <b>Linfocitos Th1</b>   | 799.3 $\pm$ 392.1    | 978.6 $\pm$ 660       |
| <b>Linfocitos Th2</b>   | 8.4 $\pm$ 5.4        | 37.2 $\pm$ 24.6*      |
| <b>Linfocitos Tc</b>  | 524 $\pm$ 195.2      | 531 $\pm$ 293.2       |
| <b>Linfocitos Treg</b>  | 12.4 $\pm$ 9.1       | 37.7 $\pm$ 25.9*      |
| <b>MDC</b>  | 9,0 $\pm$ 6,6        | 11,17 $\pm$ 5,68      |
| <b>PDC</b>  | 9,16 $\pm$ 9,75      | 11.06 $\pm$ 9,5       |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS (Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias)</b> |                      |                       |
| <b>MDC MFI CD33</b>   | 8,68 $\pm$ 1,39      | 7,49 $\pm$ 3,08       |
| <b>PDC MFI CD123</b>  | 12,44 $\pm$ 3,63     | 9,77 $\pm$ 376        |
| <b>MDC MFI IL-T3</b>  | 4,74 $\pm$ 1,34      | 4,77 $\pm$ 2,98       |
| <b>PDC MFI IL-T3</b>  | 4,62 $\pm$ 1,43      | 5,80 $\pm$ 3,53       |

\*p $\leq$ 0,05 diferencias significativas

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 3.-VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (POR ESTADIOS)</b>                                    |                |                   |                    |                   |
|---|----------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Media ± Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b>  |                |                   |                    |                   |
|   | <b>Control</b> | <b>ESTADIO II</b> | <b>ESTADIO III</b> | <b>ESTADIO IV</b> |
| <b>Leucocitos</b>   | 5937 ± 2998    | 7445.5±394        | 7562.5±2224        | 6011±766          |
| <b>Linfocitos</b>   | 1723±1111      | 1729.7 ± 528.8    | 2527.7 ± 1273.6    | 2584.6 ± 1896.2   |
| <b>Linfocitos T</b>   | 1569± 490      | 1143.7 ± 530.9    | 1700 ± 943.2       | 1404.3 ± 665.5    |
| <b>Linfocitos B</b>   | 319,59±        | 159.3 ± 3.6       | 278.8 ± 175.7      | 607.6 ± 618.3     |
| <b>Células NK</b>   | 176,21±        | 259,4± 181.8      | 306,1± 246.7       | 340,3± 33.8       |
| <b>Linfocitos Th1</b>   | 811.2 ±        | 708.5 ± 345.6     | 1060.5 ± 733.4     | 822.8 ± 414.2     |
| <b>Linfocitos Th2</b>   | 6.9± 5.0       | 22.5± 19.9*       | 35.9 ± 26.5*       | 50.3 ± 11.6       |
| <b>Linfocitos Tc</b>  | 498.3 ±        | 500.1 ± 347.7     | 555.9 ± 291.4      | 476.8 ± 282.5     |
| <b>Linfocitos Treg</b>  | 13.4± 10.1     | 45.0± 19.7*       | 36.4± 29.6*        | 28.0± 13.5        |
| <b>MDC</b>  | 8.8± 7.6       | 7.7 ± 3.6*        | 11.5± 5.9          | 13.2 ± 5.2        |
| <b>PDC</b>  | 5.1 ± 1.3      | 7.6 ± 3.4         | 4.3 ± 2.7          | 3.7 ± 1.9         |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS (Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias)</b> |                |                   |                    |                   |
| <b>MDC MFI CD33</b>   | 9.2 ± 1.1      | 6.3 ± 4,1*        | 7,4 ± 2,6*         | 8,9 ± 4,1         |
| <b>PDC MFI CD123</b>  | 13.0± 3.9      | 8.4± 2.6          | 10.1 ± 3.6         | 10 ± 5.6          |
| <b>MDC MFI ILT3</b>   | 5.1 ± 1.6      | 7.6 ± 3.4         | 4.3± 2.7           | 3.7 ± 1.9         |
| <b>PDC MFI ILT3</b>   | 5.0± 1.3       | 6.3± 4.3          | 5.1± 2.8           | 7.8± 5.6          |

\*p≤0,05 diferencias significativas

### 6.1.3 Relevancia biológica y/o clínica de los resultados.

El aumento no significativo del número absoluto de leucocitos en sangre periférica, más evidente en los Estadios II y III, no se encuentra fuera de la normalidad ya que el intervalo de este parámetro en individuos sanos se encuentra entre 5.000 y 10.000 leucocitos/ $\mu$ L y en los pacientes es del orden de 7.000 leucocitos/ $\mu$ L, similar al dato obtenido en el estudio de Neagu et al. (Neagu et al., 2013). Probablemente, este aumento no significativo de leucocitos totales en los Estadios II y III pueda explicar la tendencia similar que muestran los linfocitos totales y las células NK y otorga mayor importancia cuantitativa al descenso reversible de los linfocitos B en dichos estadios, que resulta significativo ( $p < 0.05$ ) cuando se considera el porcentaje de dicha subpoblación (control:  $5,7 \pm 3,43$ ; Estadio II:  $2,2 \pm 0,6^*$ ; Estadio III:  $3,7 \pm 1,8^*$ ; Estadio IV:  $4,3 \pm 1,5^*$ ).

Pocos estudios han incluido la caracterización de los linfocitos B en sangre periférica, entre ellos el estudio de Neagu et al. (Neagu et al., 2013) en el que se observa un aumento del porcentaje de células B según se va incrementado la malignidad del tumor, dato que sólo coincide en parte con nuestras observaciones (marcado aumento relativo de linfocitos B en el Estadio IV). Es posible que la discrepancia se deba al superior número de pacientes (143) incluidos en dicho estudio.

En la comparación de las subpoblaciones de linfocitos Th del presente estudio se ha observado que el número absoluto de linfocitos Th2 se encuentra notablemente aumentado en los pacientes con melanoma, con un patrón de incremento asociado al grado de agresividad del melanoma, siendo significativo el aumento en los Estadios II y III, y no significativo (pero más intenso) el aumento en

Estadio IV. La falta de significación estadística se debe sin duda al bajo número de pacientes incluidos en este subgrupo (4). En cuanto a la población de linfocitos Th1 no mostró cambios en los pacientes con respecto al grupo de control ni entre los diferentes estadios.

Estos hallazgos deben interpretarse a la luz de la importancia de la polarización del fenotipo Th1/Th2 en la regulación de la respuesta inmunitaria global y, específicamente, en la defensa del individuo frente a tumores sólidos como el melanoma. La respuesta inmune adaptativa es aquella generada por los linfocitos T y B, que tras la activación por el antígeno se multiplican y producen citocinas e inmunoglobulinas. Las citocinas desempeñan su papel más relevante en las respuestas reguladas por los linfocitos T, que dependen de ellas para llevar a cabo sus efectos, actuando sobre una amplia gama celular: células B, células T, macrófagos, células tisulares y células hematopoyéticas. Hace casi 40 años se describieron dos subgrupos de linfocitos Th según el patrón de citocinas que producían tras activación, denominadas Th1 y Th2. En respuesta a la estimulación antigénica, los linfocitos Th1 producen IL-2 e interferón  $\gamma$  y estimulan la inmunidad mediada por las células. Los linfocitos Th2 liberan IL-4, IL-5 e IL-10, favoreciendo la inmunidad humoral por anticuerpos. Las respuestas extremas de este espectro son capaces de inhibir el desarrollo de la contraria, y así el IFN- $\alpha$  producido por las células Th1 puede inhibir la proliferación de las células Th2. Contrariamente, la IL-4 y la IL-10 producidas por las células Th2 pueden inhibir la proliferación de las células Th1.

Con respecto al papel de la respuesta Th1 o Th2 en los pacientes con melanoma, en principio, una respuesta Th1, en donde se favorezca la inmunidad celular (linfocitos T), sería la más adecuada para la lucha

antitumoral, mientras que la respuesta Th2 sería menos efectiva en pacientes con tumores diseminados. Nuestros datos muestran, sin embargo, que es el fenotipo Th2 el que predomina en los pacientes con melanoma y parece ser más importante a medida que se consideran estadios más agresivos del tumor.

Estos resultados son altamente coincidentes con los hallazgos previos de nuestro grupo, en un estudio previo en el que se evaluó el patrón de citoquinas Th1 y Th2 en sujetos controles y pacientes con melanoma, tanto en sangre periférica activada como en biopsias de los tumores. En dicho estudio, que incluyó 19 pacientes y 6 controles se demostró que el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  (Th1) era significativamente menor en los pacientes con melanoma, independientemente de su estadio, en relación con los controles, mientras que la producción de IL-10 (Th2) se encontraba significativamente elevada en los pacientes con melanoma en comparación con los donantes sanos. Se observó una tendencia a un aumento en la producción de IL-10 en los estadios más avanzados de la enfermedad. La segunda parte del estudio mostró la existencia de un patrón Th2 o Th0 en las biopsias tanto de melanomas localizados como en las metástasis cutáneas. Aquellos datos preliminares indicaban que los linfocitos activados de los pacientes donantes sanos tienden a exhibir un fenotipo Th1, mientras que en los pacientes con melanoma se observa un aumento en la proporción de linfocitos Th2, productores de citoquinas como la IL-10, con reconocidas propiedades inmunosupresoras. El análisis del propio tumor apoyaba estos resultados, ya que el patrón hallado con mayor frecuencia era el Th2 (Botella-Estrada et al., 2002; Botella-Estrada et al., 2005).

De este modo, en dos estudios independientes, nuestro grupo, demuestra en los pacientes con melanoma una disfunción de la respuesta Th1/Th2, que se aleja del patrón Th1, beneficioso para la defensa antitumoral basada en células (linfocitos Tc, células NK) y se polariza hacia la respuesta mediada por anticuerpos, escasamente protectora frente a un tumor sólido.

Otro dato que apoya una situación de inmunosupresión funcional en la respuesta frente al melanoma en los pacientes de nuestro estudio, es el marcado y significativo aumento de las células Treg en los pacientes, y que aumenta de forma paralela la estratificación. Las células Treg son esenciales para el mantenimiento de la tolerancia y la prevención de la autoinmunidad. Su deficiencia se asocia con enfermedades autoinmunitarias y alergias, y su aumento se relaciona con el cáncer. Aunque son escasas en la circulación (5-10% de todas las células T CD4+) tienen elevada capacidad para inhibir activamente a linfocitos Th, linfocitos Tc, células dendríticas, células NK, células NKT y linfocitos B.

El papel de las células Treg en la generación y la progresión del melanoma está cada vez más aceptado. La respuesta inmunitaria en caso de melanoma rara vez es curativa, lo que sugiere la existencia de cierta inmunosupresión. Hay datos que apoyan que el melanoma evade el sistema inmunitario mediante el aumento de células reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ y un aumento en la ferritina H. La liberación de ferritina H da lugar a la activación de células Treg funcionales productoras de IL-10. Las células TregCD4+CD25+FOXP3+ se encuentran en los *nevus* atípicos y compuestos, y en los melanomas en fase de crecimiento radial, lo que sugiere que inducen inmunotolerancia

en la fase inicial de la génesis del melanoma y favorecen el crecimiento del mismo. La frecuencia de las Treg aumenta con la progresión de la enfermedad y su acumulación en pacientes con melanoma avanzado se correlaciona con una reducción general de la capacidad de respuesta de las células T a antígenos de memoria. Su evaluación dentro del tumor podría ser útil para fines de pronóstico y seguimiento(Wang and Wang, 2007), (Ilkovitch, 2011).Por otra parte, también se ha descrito un aumento considerable en las células Treg en la dermis yuxta-tumoral de pacientes con carcinoma basocelular. Las células Treg se detectan en los márgenes pseudocapsulares y penetrando en los nódulos tumorales. En este tipo de cáncer, la presencia de células Treg alrededor de los nódulos tumorales, puede atenuar la función de las células dendríticas y las T efectoras. Los mecanismos no están del todo claros, pero se propone que pueden actuar impidiendo la maduración de las células dendríticas o suprimiendo la expresión de sus coestimuladoras. La radiación ultravioleta puede aumentarla IL-10, lo que también contribuye al ambiente inmunosupresor(Kaporis et al., 2007),(Escobar C., 2011)

Con respecto a las poblaciones de células dendríticas, se observa una tendencia no significativa al aumento de las células dendríticas mieloides en los Estadios III y IV, y una tendencia opuesta, la disminución en dichos estadios, de las células dendríticas plasmocitoides, por lo que el cociente mieloides/plasmocitoides tiende a aumentar en paralelo al estadio del melanoma. Las poblaciones de células dendríticas circulantes en pacientes con melanoma, son, además, fenotípicamente diferentes a las encontradas en sangre periférica normal, con menor expresión de CD33 y CD123 y expresión variable de ILT3. Esta disminución de la expresión es diferente según el estadio de malignidad. Así en Estadio II las células se caracterizan por tener un

fenotipo más inmunosupresor (Aspord et al., 2014) , relacionado con un aumento de la expresión de ILT3 que se mantiene en el Estadio IV para las células plasmocitoides, pero no en las mieloides.

Estos hallazgos de nuestro estudio están muy en consistencia con mecanismos de acción de las células plasmocitoides infiltrantes de tumor, recientemente descubiertos. Estas células, que se encuentran en altas proporciones en el melanoma cutáneo y los ganglios linfáticos de drenaje tumoral, se asocian con un peor pronóstico clínico. Se ha demostrado que las células dendríticas plasmocitoides que migran al microambiente tumoral del melanoma muestran características particulares, siendo capaces de inducir una respuesta proinflamatoria Th2 y de disminuir la respuesta inmunitaria a través de la expresión de OX40L e ICOSL. Sorprendentemente algunas señales quimiotácticas (TARC, CCL17, MDC, CCL22, y MMP-2) presentes en el microambiente del melanoma se asocian con la acumulación de pDC, la regulación a la baja por OX40L y modulación ICOSL, y la recaída temprana. Por lo tanto, parece que el melanoma podría explotar activamente la plasticidad de las células plasmocitoides para promover su propia progresión.

Se ha observado en varios estudios que el aumento de células dendríticas con capacidad inmunosupresora está en relación con el aumento del número de células Treg, (Ju et al., 2004), (Vlad et al., 2009) Este hecho junto con el aumento de las respuestas Th2 en el melanoma podrían favorecer la progresión y expansión del melanoma, limitando la respuesta de las células citotóxicas (Bacchetta et al., 2007), (Rafique et al., 2015), (Ascierto et al., 2010).

## **6.2 Estudio comparativo de las poblaciones leucocitarias y las subpoblaciones linfocitarias y de células dendríticas en pacientes con melanoma sometidos a tratamiento.**

Tras determinar las poblaciones inmunitarias por citometría de flujo en muestras de sangre periférica, los 25 pacientes incluidos en este estudio fueron tratados con Interferón  $\alpha$ , de acuerdo con el régimen descrito en el apartado de Metodología. Brevemente, el tratamiento comprendió dos etapas. En la fase de inducción (30 días) los pacientes recibieron 5 dosis semanales de 20 millones de unidades/m<sup>2</sup> de Interferón  $\alpha$ 2b. En el estudio de los 5 meses de la fase de mantenimiento los pacientes fueron tratados con 3 dosis semanales de 10 millones de unidades/m<sup>2</sup> de Interferón  $\alpha$ .

En esta parte del estudio comparativo, se extrajeron y analizaron muestras de sangre periférica inmediatamente antes de iniciar el tratamiento y en cuatro etapas del mismo, que permitieron evaluar los cambios inmunitarios al final de la fase de inducción (día 30) y durante el período de mantenimiento (día 90) y (día 180). Los resultados de esta parte del estudio se muestran en la Tabla 4 y en las Figuras 6A y 6B.

### **6.2.1 Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo.**

Los resultados cuantitativos del análisis citométrico de las poblaciones de células inmunitarias en muestras de sangre periférica del grupo total de pacientes con melanoma, obtenidas inmediatamente antes de iniciar el tratamiento y a lo largo del mismo, se recogen en la Tabla 4.

Como puede observarse, el número absoluto de leucocitos disminuye de forma progresiva y significativa a los 30 días y 90 días de tratamiento, pero retorna a un nivel normal en el día 180, en la mitad del mantenimiento. Al distinguir entre subpoblaciones específicas de células inmunitarias se comprueba un patrón de evolución similar desde el punto de vista cualitativo, pero con ciertas diferencias cuantitativas (que se comentarán más adelante) para la mayoría de las subpoblaciones estudiadas, mientras que en el caso de los linfocitos Th2 y de las células dendríticas, la evolución de las variaciones es distinta.

Así, los linfocitos totales, los linfocitos T, los linfocitos B, las células NK, los linfocitos Th1 y las células Treg siguen el patrón de variaciones de los leucocitos totales, aunque no llegan a recuperar a los 180 días el valor previo al tratamiento. Los linfocitos Th2 no ven modificados significativamente sus niveles en sangre a lo largo del tratamiento, mientras que los linfocitos Tc y las células dendríticas, tanto plasmocitoides como mieloides, disminuyen progresivamente sus niveles y no tienden a la recuperación a los 180 días del tratamiento. Hay que indicar que las variaciones observadas no siempre alcanzaron valor significativo para todos los puntos temporales de corte y todas las subpoblaciones, probablemente debido a la elevada variabilidad individual y al número limitado de pacientes incluidos en el estudio.

Con respecto a las variaciones en la expresión de moléculas de superficie relacionadas con el papel regulador de las células dendríticas, las variaciones más importantes (aunque no significativas) se observaron en la expresión de la molécula ILT-3, que aumentó marcadamente a los 90 días, tanto en las células plasmocitoides como mieloides, volviendo a la normalidad a los 180 días. La expresión de CD123 disminuyó no significativamente a los 90 y 180 días en las células dendríticas plasmocitoides. No se detectaron variaciones en la expresión de CD33 en las células dendríticas mieloides.

Para poder profundizar con más detalle en los aspectos cuantitativos y en la secuencia temporal de las variaciones recogidas en la Tabla 4, comparando con mayor eficacia los datos específicos de las distintas subpoblaciones estudiadas se ha diseñado las Figuras 6A y 6B, que recogen las variaciones calculadas en forma de ratio o cociente con respecto al número absoluto de cada subpoblación inmunitaria antes del tratamiento, al que se asigna el valor 1. De esta forma, se normalizan las variaciones, lo que permite, además, estimar mucho mejor la intensidad de los cambios en subpoblaciones muy poco abundantes en sangre periférica.

El análisis de las Figuras 6A y 6B permite comparar longitudinalmente (a lo largo de los días de tratamiento) y transversalmente (en cada subpoblación inmunitaria) los cambios. En cuanto a los cambios longitudinales, la Fig. 6A muestra que, en general, la mayor intensidad de variación a la baja en la concentración de las poblaciones inmunitarias que siguen el patrón de los leucocitos totales se observa a los 90 días, es decir, al comienzo de la fase de mantenimiento. A los 30 días, al final de la fase de inducción, ya se

observan cambios en casi todas las subpoblaciones inmunitarias estudiadas. A los 180 días, se observa una tendencia al aumento relativo de la concentración en muchas de las subpoblaciones inmunitarias estudiadas, pero sólo en algunos casos se observa una recuperación total de los valores del día 0 pre-tratamiento.

La interpretación de las variaciones específicas de cada subpoblación estudiada se puede abordar a partir de la Figura 6B. Como se puede observar, a los 90 días del tratamiento, las mayores disminuciones relativas corresponden a las células NK, los linfocitos B y los linfocitos Treg, seguidos por los linfocitos totales y los linfocitos T. En todos estos casos el descenso relativo en concentración celular fue más intenso que el de los leucocitos, indicando que estos cambios son específicos de subpoblación y no son un mero reflejo de la leucopenia relativa observada. Por el contrario, los descensos relativos de linfocitos Tc, linfocitos Th1 y células dendríticas plasmocitoides fueron del mismo orden al de los leucocitos, por lo que podrían ser consecuencia del descenso general del recuento leucocitario. Las células dendríticas mieloides, por su parte, disminuyen menos que el recuento total leucocitario.

A los 30 días de tratamiento, es decir, al final de la fase de inducción, sólo las células dendríticas plasmocitoides han disminuido por debajo del descenso relativo de los leucocitos, mientras que el resto de subpoblaciones han disminuido en grado similar (linfocitos, linfocitos B) o menor (linfocitos T, células NK, linfocitos Th1) que los leucocitos o no han disminuido apenas (linfocitos Treg, linfocitos Th2, células dendríticas mieloides).

### Resultados y desarrollo argumental

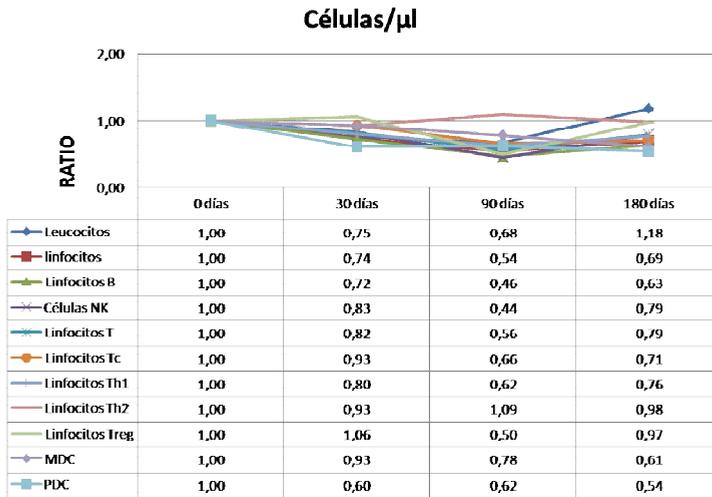
Al final del estudio (día 180) sólo los linfocitos Th2 y Treg se encuentran en su valor basal mientras que, por el contrario, las células dendríticas plasmocitoides y mieloides se mantienen en valores de concentración cercanos al 50% de su valor pre-tratamiento. La mayor parte de las demás subpoblaciones sólo vuelven a un nivel similar o ligeramente inferior al observado en el día 30, con excepción de los linfocitos Tc, que mantienen casi el nivel mínimo que alcanzaron en el día 90.

*Resultados y desarrollo argumental*

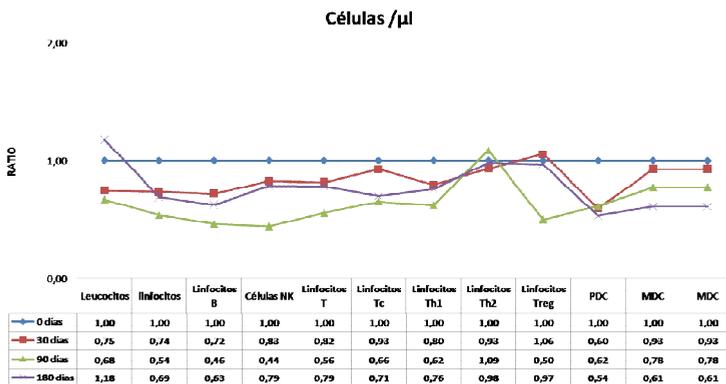
| <b>Tabla 4. VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (A LO LARGO DEL TRATAMIENTO) Media <math>\pm</math> Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b> |                     |                      |                       |                     |
|---|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
|   | <b>DIA 0</b>        | <b>DIA 30</b>        | <b>DIA 90</b>         | <b>DIA 180</b>      |
| <b>Leucocitos</b>   | 7695 $\pm$ 2432,1   | 5610.8 $\pm$ 3243.7* | 4940.9 $\pm$ 1932.9*  | 8631.8 $\pm$ 2959,7 |
| <b>Linfocitos</b>   | 2490.4 $\pm$ 1313.9 | 1792.2 $\pm$ 939.59* | 1321.23 $\pm$ 706.94* | 1681.1 $\pm$ 651.51 |
| <b>Linfocitos T</b>   | 1576.9 $\pm$ 875.6  | 1292.9 $\pm$ 687.1   | 883.5 $\pm$ 652.6     | 1241.4 $\pm$ 676.8  |
| <b>Linfocitos B</b>   | 312.9 $\pm$ 298.3   | 226.84 $\pm$ 251.8   | 145.33 $\pm$ 114.41*  | 196.77 $\pm$ 87.7   |
| <b>Células NK</b>   | 302.95 $\pm$ 248.7  | 251.9 $\pm$ 256.3    | 134.8 $\pm$ 110.3*    | 240.49 $\pm$ 205.59 |
| <b>Linfocitos Th1</b>   | 978.6 $\pm$ 660.6   | 782.22 $\pm$ 364.4   | 611.6 $\pm$ 385.9*    | 746.1 $\pm$ 478.4   |
| <b>Linfocitos Th2</b>   | 36.95 $\pm$ 24.6    | 34.5 $\pm$ 32.9      | 40.3 $\pm$ 88.7       | 36.2 $\pm$ 37.5     |
| <b>Linfocitos Tc</b>  | 531.4 $\pm$ 293.2   | 491.8 $\pm$ 345.5    | 349.6 $\pm$ 189.6*    | 374.6 $\pm$ 210.5*  |
| <b>Linfocitos Teg</b>   | 37.6 $\pm$ 25.9     | 39.8 $\pm$ 21.2      | 18.9 $\pm$ 14.0*      | 36.5 $\pm$ 25.7     |
| <b>MDC</b>  | 11.2 $\pm$ 5.7      | 10.38 $\pm$ 5.1      | 8.7 $\pm$ 6           | 6.8 $\pm$ 4.6       |
| <b>PDC</b>  | 11.6 $\pm$ 9.5      | 6.9 $\pm$ 4.6        | 7.1 $\pm$ 5.2         | 6.2 $\pm$ 5.7*      |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS (Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias)</b>   |                     |                      |                       |                     |
| <b>MDC MFI CD33</b>   | 7.5 $\pm$ 3.8       | 7.9 $\pm$ 3.7        | 7.8 $\pm$ 2.8         | 7.5 $\pm$ 3.7       |
| <b>PDC MFI CD123</b>  | 9.8 $\pm$ 3.6       | 9.7 $\pm$ 3.7        | 7.4 $\pm$ 3.0         | 7.2 $\pm$ 3.0       |
| <b>MDC MFI IL-T3</b>  | 4.7 $\pm$ 2.9       | 6.0 $\pm$ 4.0        | 7.2 $\pm$ 4.0         | 5.0 $\pm$ 1.9       |
| <b>PDC MFI IL-T3</b>  | 5.8 $\pm$ 3.5       | 6.2 $\pm$ 2.3        | 10.6 $\pm$ 14.8       | 6.3 $\pm$ 2.8*      |

\*p $\leq$ 0,05 diferencias significativas

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 6A.** Estudio de las variaciones del ratio a lo largo del tratamiento



**Figura 6B** Estudio de las variaciones del ratio en las poblaciones leucocitarias

**6.2.2 Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según el estadio al diagnóstico (EstadiosII y III).**

Al igual que en el estudio basal, la disponibilidad de datos citométricos en los pacientes sometidos a tratamiento, permitió un análisis más detallado, mediante el cual se evaluó el efecto inmunitario del tratamiento en diferentes subgrupos de pacientes.

El primer estudio de subgrupos de pacientes se realizó para comparar la evolución de las células inmunitarias durante el tratamiento en pacientes con diferente estadio del melanoma al diagnóstico.

Los resultados numéricos del estudio estratificado se presentan en las Tablas 5a y 5b. Como ocurría en el estudio de las variaciones en el grupo no estratificado de pacientes, los cambios con mayor grado de significación estadística con respecto a los valores determinados antes del tratamiento se observan a los 90 días en ambos subgrupos. Sin embargo, en algunas subpoblaciones se detectan diferencias entre los pacientes de Estadio II y III ya en el día 30 de tratamiento (final de la fase de inducción). En algunos casos, las diferencias entre los estadios son más marcadas en las muestras del día 180, obtenidas al final del estudio. Hay que indicar que también en este análisis por estadios, no todas las comparaciones de las diferentes subpoblaciones inmunitarias con sus respectivos valores basales son significativas, ni tampoco las diferencias entre estadios para cada una de las distintas subpoblaciones inmunitarias en los momentos del análisis. El número limitado de pacientes analizados limita el valor estadístico de nuestras observaciones pero, aún así, los datos sugieren tendencias que vale la

pena considerar para su posible confirmación en estudios futuros más amplios.

De nuevo, para facilitar las comparaciones entre diferentes células inmunitarias y entre diferentes tiempos, se han representado en las Figuras 7A y 7B las variaciones en los ratios del número absoluto de células con respecto al valor basal pretratamiento, al que se asigna el valor de 1. Este tipo de presentación muestra que los patrones de evolución de las poblaciones son diferentes en muchos casos, según los pacientes pertenezcan al grupo de Estadio II o III.

Así, las variaciones bifásicas observadas previamente en los leucocitos totales en el grupo de pacientes (Figura 6) se ven acentuadas en los pacientes en Estadio II y, al contrario que con el grupo general, su patrón de evolución en estos pacientes es diferente al que se observa en todas las subpoblaciones descritas en las Figuras 7A y 7A. Los cambios relativos en las subpoblaciones inmunitarias de los pacientes en Estadio II son mucho más marcadas que en los pacientes en Estadio III. En ellos, la evolución de las subpoblaciones inmunitarias es mucho más parecida a la que se observó en el grupo general de pacientes no estratificados por el estadio (Figuras 6A y 6B).

Al comparar los distintos tiempos de tratamiento, se observa que al final de la fase de inducción (30 días) no hay diferencia entre los estadios en cuanto a leucocitos totales, linfocitos B y células dendríticas plasmocitoides. Para el resto de subpoblaciones, con excepción de las células Treg que disminuyen en Estadio II, en los pacientes en Estadio II se observa una tendencia al aumento de los niveles absolutos, mientras que en los de Estadio III se tiende a disminuir el número absoluto, salvo las ya indicadas células Treg que aumentan. Las menores diferencias

entre estadios, en general, se observan a los 90 días, salvo para las células dendríticas plasmocitoides, que se encuentran muy aumentadas en los pacientes en estadio II.

En cuanto a los marcadores específicos de células dendríticas, no se observan diferencias significativas entre los pacientes agrupados según el estadio en ninguno de los puntos temporales, con la excepción de ILT-3 en células dendríticas mieloides. La expresión relativa de este marcador en los pacientes de Estadio III aumenta en el día 30 de tratamiento y se mantiene estable hasta el final del tratamiento. En los pacientes en Estadio II, se observa un efecto bifásico, con un aumento de expresión al día 90 y un marcado descenso posterior (Fig. 7A).

Si consideramos el estado de las subpoblaciones al final del estudio, se observan diferencias entre los estadios en el número absoluto de casi todas ellas, excepto en el caso de linfocitos B y células NK (Figura 7A), especialmente evidentes para las subpoblaciones de linfocitos T: linfocitos Th1, linfocitos Th2, linfocitos Tc y linfocitos Treg, y para las células dendríticas

Es importante destacar los complejos cambios en las subpoblaciones funcionales de células T en dicho momento. Los pacientes en estadio III con respecto a los del Estadio II tienen disminuidos los linfocitos Th1 y Tc, indicadores inmunológicos de una respuesta de tipo celular, la más protectora frente al melanoma. Por el contrario, los pacientes en el Estadio III muestran, con respecto a los del Estadio II, un aumento relativo de linfocitos Th2, favorecedores de una respuesta humoral, menos adecuada en la defensa antitumoral y, sobre todo, un nivel más elevado de linfocitos Treg, células implicadas en la

### Resultados y desarrollo argumental

inducción de supresión de respuestas inmunitarias a tumores y responsables de ciertos procesos de tolerancia inmunológica.

Además, hay que destacar la mayor expresión relativa en las células dendríticas mieloides de los pacientes de Estadio III de la moléculas ILT-3, que participa en respuestas de inhibición de la función linfocitaria (Vlad et al., 2009). Esta observación apoya aún más la situación de inmunosupresión relativa en los linfocitos de los pacientes en Estadio III con respecto a los del grupo de Estadio II.

*Resultados y desarrollo argumental*

| <b>Tabla 5a VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (ESTADIOS II Y III A LO LARGO DEL TRATAMIENTO) Media ± Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b> |              |               |                |                |
|--|--------------|---------------|----------------|----------------|
|  | <b>DIA 0</b> | <b>DIA 30</b> | <b>DIA 90</b>  | <b>DIA 180</b> |
| <b><u>Leucocitos</u></b>   |              |               |                |                |
| <b>ESTADIO II</b>  | 7445±394.7   | 6536.1±3586   | 4529.2±1771.6  | 4321.5±1607.3  |
| <b>ESTADIO III</b>   | 7520.1±2285  | 5544.32±3504  | 4787.3±1939.9* | 9309±1287      |
| <b><u>Linfocitos</u></b>   |              |               |                |                |
| <b>ESTADIO II</b>  | 1729±528     | 2100±1900     | 1155.9±115.9*  | 1674.1±482.5   |
| <b>ESTADIO III</b>   | 2522.2±1311  | 1858.1±831.9  | 1313.1±817*    | 1673.4±748.4   |
| <b><u>Linfocitos T</u></b>   |              |               |                |                |
| <b>ESTADIO II</b>  | 1143.7±530.9 | 1330±776.2    | 819.9±102.1*   | 1264.5±689     |
| <b>ESTADIO III</b>   | 1919.4±968.5 | 1425.6±682.3  | 859.0±756.2*   | 1238.9±744.8   |
| <b><u>Linfocitos B</u></b>   |              |               |                |                |
| <b>ESTADIO II</b>  | 159.2±36.9   | 90.04±22.2    | 63.6±11.4      | 117.2±31.4     |
| <b>ESTADIO III</b>   | 279.7±181    | 209.9±162.3   | 158.8±123.1*   | 210.7±86.4*    |
| <b><u>Células NK</u></b>   |              |               |                |                |
| <b>ESTADIO II</b>  | 259.2±181.8  | 391.3±589     | 188.5±156.3    | 247.3±217.4    |
| <b>ESTADIO III</b>   | 304.4±254.2  | 252.6±190.7   | 122.6±105.1*   | 249.2±221.7    |

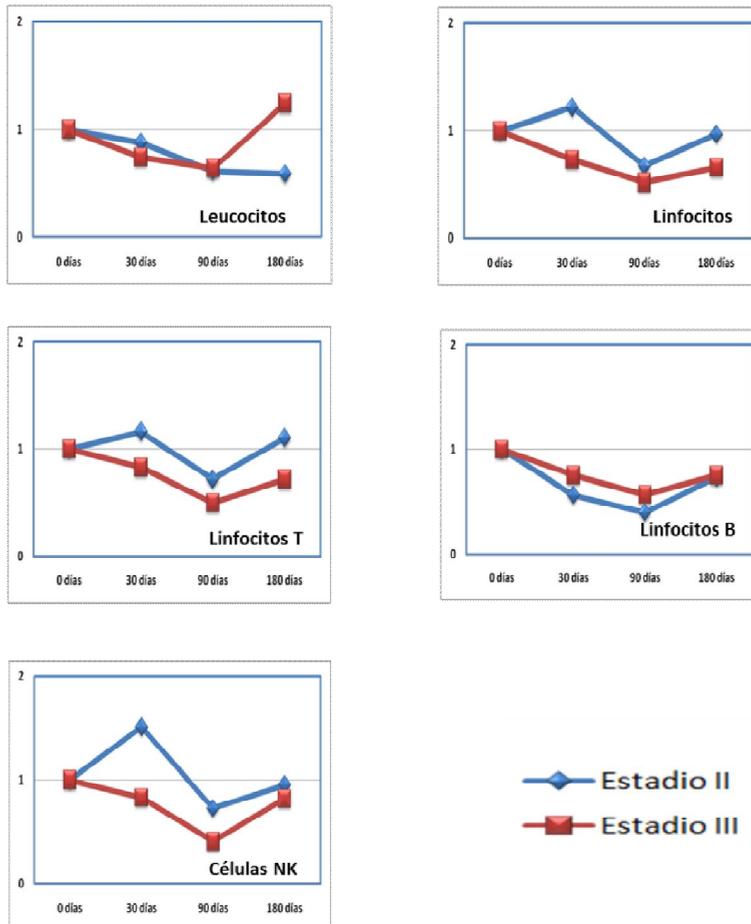
\*p≤0,05 diferencias significativas

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 5b VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (ESTADIOS II Y III A LO LARGO DEL TRATAMIENTO) Media ± Desviación Estándar (células /µl).</b> |              |               |               |                |
|---|--------------|---------------|---------------|----------------|
|   | <b>DIA 0</b> | <b>DIA 30</b> | <b>DIA 90</b> | <b>DIA 180</b> |
| <b><u>Linfocitos Th1</u></b>  |              |               |               |                |
| <b>Estadio II</b>   | 708.5±345.6  | 776.3±365.4   | 509.1±142.2*  | 718.4±392.1    |
| <b>Estadio III</b>  | 1078.7±751.7 | 829.3±413.3   | 643.4±453.8   | 786.8±540.6    |
| <b><u>Linfocitos Th2</u></b>  |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 22.5±19.93   | 26.5±4.6      | 23.9±9.9      | 13.22±10.9     |
| <b>ESTADIO III</b>  | 37.21±26.7   | 34.7±32.2     | 45.6±105.9    | 41.1±42.0      |
| <b><u>Linfocitos Tc</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 500.1±347.6  | 608.6±613.7   | 316.2±95.4    | 513.9±222.5    |
| <b>ESTADIO III</b>  | 551.6±299.8  | 517.8±319.2   | 332.2±198.3*  | 301.7±172.2*   |
| <b><u>Linfocitos Treg</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 45.2±19.7    | 32.7±4.6      | 22.3±12.6     | 16.9±1.6       |
| <b>ESTADIO III</b>  | 38.3±29.9    | 43.4±23.4     | 16.6±14.43    | 41.8±28.1      |
| <b><u>MDC</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 7.7±3.5      | 8.9±4.9       | 7.5±3.7       | 7.3±4.5        |
| <b>ESTADIO III</b>  | 11.5±0.1     | 10.4±5.1      | 7.6±5.5       | 6.9±.1*        |
| <b><u>PDC</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 7.3±2.7      | 6.4±2.5       | 8.3±5.7*      | 5.7±1.5        |
| <b>ESTADIO III</b>  | 11.9±9.6     | 8.2±5.12      | 6.4±5.2       | 6.4±5.5        |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS ((Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias)</b>  |              |               |               |                |
| <b><u>MDC MFI CD33</u></b>  |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 6.33±4.1     | 5.77±3.4      | 7.1±7.3       | 7.6±6.3        |
| <b>ESTADIO III</b>  | 7.4±2.6      | 8.6±3.2       | 7.8±1.9       | 6.9±2.8        |
| <b><u>PDC MFI CD123</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 9.7±3.7      | 7.2±1.4       | 5.3±1.6       | 6.1±2.7        |
| <b>ESTADIO III</b>  | 12±1.7       | 11.9±1.3      | 8.5±2.3       | 8.6±4.2        |
| <b><u>MDC MFI ILT-3</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 7.65±3.4     | 5.48±1.6      | 12.5±8.5      | 3.7±0.6        |
| <b>ESTADIO III</b>  | 4.35±2.8     | 6.01±3.8      | 6.2±2.3       | 5.3±2.1        |
| <b><u>PDC MFI ILT-3</u></b>   |              |               |               |                |
| <b>ESTADIO II</b>   | 8.4±2.7      | 6.7±1.4       | 6.3±1.5       | 5.1±2.7        |
| <b>ESTADIO III</b>  | 10±3.7       | 10.2±3.9      | 7.7±3.4       | 7.9±3.1        |

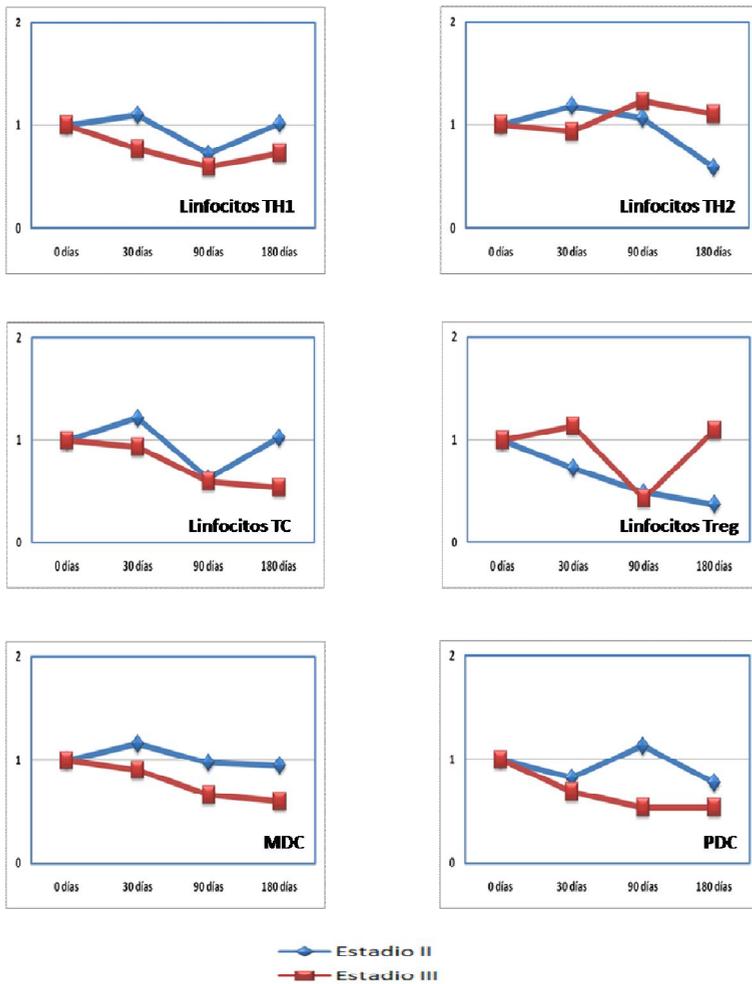
\*p<0,05 diferencias significativas

Resultados y desarrollo argumental



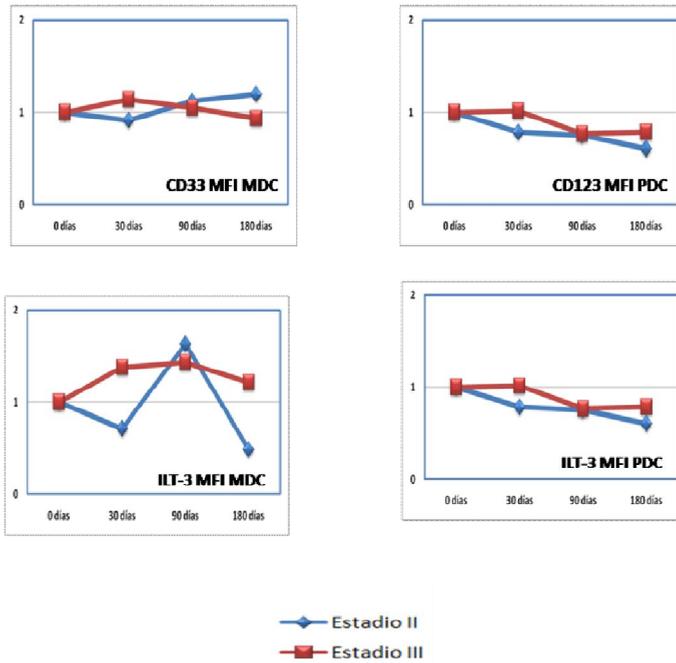
**Figura 7A.** Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las poblaciones leucocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B y Células NK en pacientes con melanoma Estadio II vs Estadio III.

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 7B.** . Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Tc y Treg) y poblaciones de células dendríticas.(MDC y PDC) en pacientes con melanoma Estadio II vs Estadio III.

*Resultados y desarrollo argumental*



**Figura 7C.** Estudio de las variaciones del Ratio de la Intensidad Media de Fluorescencia de los marcadores CD33 e ILT-3 en la población MDC Y CD123 e ILT-3 en la población PDC en pacientes con melanoma Estadio II vs Estadio III.

**6.2.3 Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario.**

La presencia de ulceración, definida como la ruptura de la piel sobre el melanoma, es una de las principales características histopatológicas y se considera un factor de peor pronóstico. La presencia o ausencia de ulceración es un parámetro que se utiliza para establecer subdivisiones en los estadios T2 a T4. Por dicha razón, se han clasificado los pacientes de nuestro estudio en dos grupos, según presenten o no un melanoma ulcerado. La comparación del efecto del tratamiento en ambos grupos se presenta en las Tablas 6a y 6b. Del total de pacientes, 12 presentaron ulceración asociada al tumor primario.

Como puede observarse, hay diferencias significativas entre ambos grupos para los linfocitos B a los 90 días de tratamiento (Tabla 6a), punto temporal en que los linfocitos B de los pacientes con ulceración presentan el mayor descenso relativo. A los 90 días, las células dendríticas (mieloides y plasmocitoides) del grupo con melanoma ulcerado presentan un marcado y significativo aumento de la expresión de la molécula ILT-3 (Tabla 6b). Hay que destacar que el análisis previo al tratamiento ya mostró diferencias significativas entre los pacientes sin ulceración y los pacientes con ulceración, que presentaron un número absoluto casi del doble que el grupo no ulcerado.

Aunque, de nuevo, la mayor parte de las comparaciones no alcanzan significación estadística, la comparación de las variaciones temporales de las subpoblaciones inmunitarias, expresadas en forma de ratio, muestra una distinta secuencia de cambios entre pacientes

ulcerados o no, para algunas subpoblaciones inmunitarias. Además de las diferencias significativas indicadas en los linfocitos B y en la molécula ILT-3, se observan interesantes diferencias en las poblaciones de células NK, linfocitos Th2, linfocitos Tc, linfocitos Treg y células dendríticas de ambos tipos. Salvo cambios puntuales, el tratamiento en los pacientes con ulceración indujo descensos relativos más marcados en dichas subpoblaciones, con respecto a los pacientes no ulcerados. En cuanto a los cambios relativos en ILT-3, esta molécula tolerogénica se encuentra muy aumentada en las células dendríticas de los pacientes ulcerados hasta el día 90 de tratamiento. (Figuras 8A-8C)

Al final del tratamiento, sólo se observan diferencias importantes entre los dos grupos de pacientes, para las células NK y linfocitos Treg, aunque, como se ha indicado el patrón de variaciones temporales diferencia bastante el comportamiento de ambos grupos

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 6a VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES TUMORES SIN O CON ULCERACION DEL TUMOR PRIMARIO A LO LARGO DEL TRATAMIENTO</b> |                |               |                          |                |
|--|----------------|---------------|--------------------------|----------------|
| <b>Media ± Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b>   |                |               |                          |                |
|  | <b>DIA 0</b>   | <b>DIA 30</b> | <b>DIA 90</b>            | <b>DIA 180</b> |
| <b><u>Leucocitos</u></b>   |                |               |                          |                |
| <b>SIN ULCERACION</b>  | 7192.6±2518.23 | 5131.3±2727.1 | 5884.7±1830.2            | 7071.1±4720.2  |
| <b>CON ULCERACION</b>  | 7468.5±1206.9  | 5786.2±3603.1 | 4037.12±1686.3*          | 9802.3±5630.2  |
| <b><u>Linfocitos</u></b>   |                |               |                          |                |
| <b>SIN ULCERACION</b>  | 2255.9±1433.34 | 1704.2±1182.2 | 1646,4±906,6             | 1589,1±392,2   |
| <b>CON ULCERACION</b>  | 2584.6±1233.4  | 1856.9±760.2  | 1019,7±292,4*            | 1750,0±815,9*  |
| <b><u>Linfocitos T</u></b>   |                |               |                          |                |
| <b>SIN ULCERACION</b>  | 1512.7±1060.9  | 1027.7±710.3  | 997,8±950,6              | 1129,6±319,4   |
| <b>CON ULCERACION</b>  | 1646.0±659.15  | 1491.3±625.0  | 783,3±231,3              | 1326,0±870,3   |
| <b><u>Linfocitos B</u></b>   |                |               |                          |                |
| <b>SIN ULCERACION</b>  | 267.3±188.6    | 241.6±339.5   | 208,1±136,3*             | 216,1±92,9     |
| <b>CON ULCERACION</b>  | 361.11±387.6   | 215.7±176.6   | 90,3±53,3*, <sup>‡</sup> | 182,2±86,9     |
| <b><u>Células NK</u></b>   |                |               |                          |                |
| <b>SIN ULCERACION</b>  | 269.3±282.1    | 292.44±352.5  | 166,1±120,5              | 273,2±209,4    |
| <b>CON ULCERACION</b>  | 339.4±212.1    | 218.8±151.2   | 107,4±100,2              | 215,9±213,4*   |

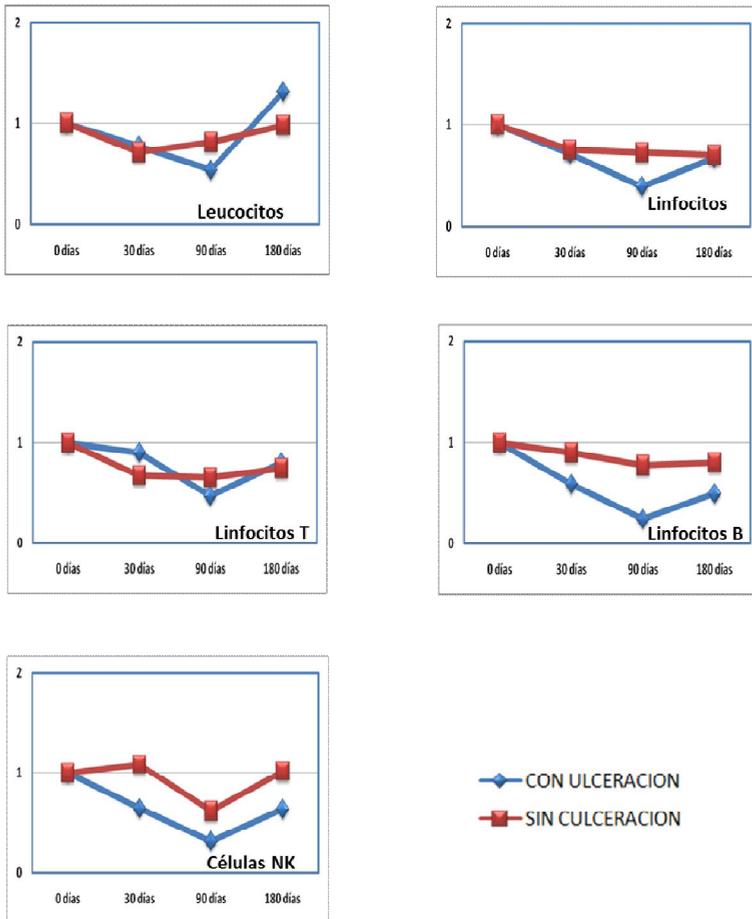
\*p≤0,05 diferencias significativas (muestra basal); <sup>‡</sup>p≤0,05 diferencias significativas (entre grupos)

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 6b VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES TUMORES SIN O CON ULCERACION DEL TUMOR PRIMARIO A LO LARGO DEL TRATAMIENTO</b> |                        |                                     |               |                        |
|--|------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------------|
| <b>Media ± Desviación Estándar (células /µl).</b>  |                        |                                     |               |                        |
|  | <b>DIA 0</b>           | <b>DIA 30</b>                       | <b>DIA 90</b> | <b>DIA 180</b>         |
| <b><u>Linfocitos Th1</u></b>   |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 818.1 ± 481.2          | 694.1 ± 146.6 <sup>&amp;&amp;</sup> | 707.4 ± 524.0 | 599.3 ± 274.0          |
| CON ULCERACION   | 1038.4± 699.9          | 809.1± 410.4                        | 515,7 ± 163.6 | 809.1± 410.4           |
| <b><u>Linfocitos Th2</u></b>   |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 40.88 ± 18.7           | 33.6 ± 35.6                         | 40.88 ± 18.7  | 33.6 ± 35.6            |
| CON ULCERACION   | 36.2±25.4              | 34.8±33.5                           | 36.2±25.4     | 34.8±33.5              |
| <b><u>Linfocitos Tc</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 541.4 ± 382.3          | 504.7 ± 366.8                       | 541.4 ± 382.3 | 504.7 ± 366.8          |
| CON ULCERACION   | 578.1±273.9            | 487.8±351                           | 578.1±273.9   | 487.8±351              |
| <b><u>Linfocitos Treg</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 34,2±23,7              | 32.8±20.3                           | 25.9±17.7     | 48.1±29.1              |
| CON ULCERACION   | 41,4±28,7              | 43.9±21.5                           | 14.5±10.0     | 27.8±20.4 <sup>*</sup> |
| <b><u>MDC</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 10.8±5.6               | 10.5±4.4                            | 11.0±7.2      | 5.6±1.8                |
| CON ULCERACION   | 11,6±5.8               | 10.3±5.9                            | 6.8±4.4       | 7.8±5.9                |
| <b><u>PDC</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 7.8±4.2                | 5.3±3.3                             | 10.3±5.2      | 5.3±1.7                |
| CON ULCERACION   | 15.7±11.8 <sup>¥</sup> | 8.1±5.2                             | 4.4±3.3       | 6.9±6.1                |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS ((Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias))</b>                        |                        |                                     |               |                        |
| <b><u>MDC MFI CD33</u></b>   |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 5.2±3.0                | 9.4±3.0                             | 8.4±2.5       | 9.1±3.4                |
| CON ULCERACION   | 6.7±3.1                | 6.8±4.0                             | 7.2±3.2       | 6.3±3.7                |
| <b><u>PDC MFI CD123</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 10.3±3.4               | 9.9±3.6                             | 8.8±3.3       | 6.6±2.6                |
| CON ULCERACION   | 9.2±4.2                | 9.6±3.9                             | 6.0±2.0       | 6.5±3.3                |
| <b><u>MDC MFI ILT-3</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 5.2±3.5                | 5.7±4.0                             | 5.4±1.5       | 5.0±2.3                |
| CON ULCERACION   | 4.3±2.4                | 6.3±4.2                             | 9.1±5.03      | 4.9±1.7                |
| <b><u>PDC MFI ILT-3</u></b>  |                        |                                     |               |                        |
| SIN ULCERACION   | 5.9±2.8                | 5.7±2.1                             | 6.3±1.4       | 6.6±2.1                |
| CON ULCERACION   | 5.7±4.3                | 6.6±3.9                             | 14.9±13.6     | 6.0±2.1                |

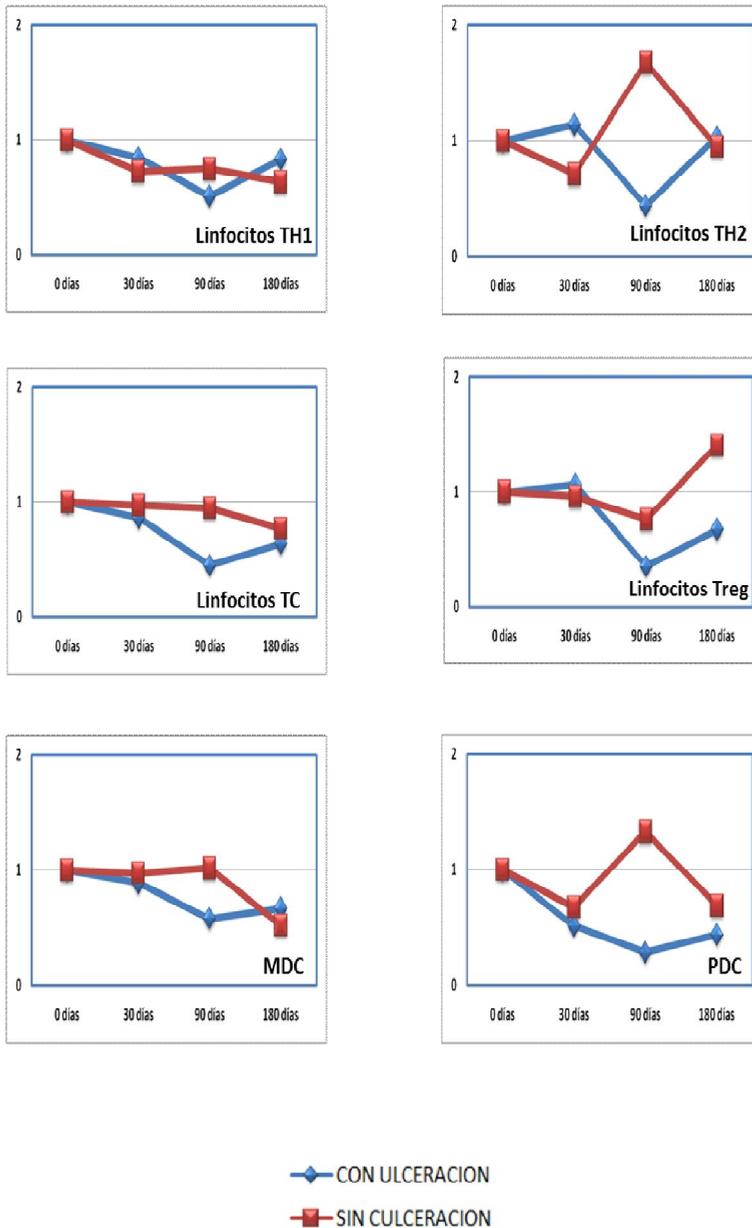
\*p<0,05 diferencias significativas (muestra basal); ¥ p<0,05 diferencias significativas (entre grupos)

Resultados y desarrollo argumental



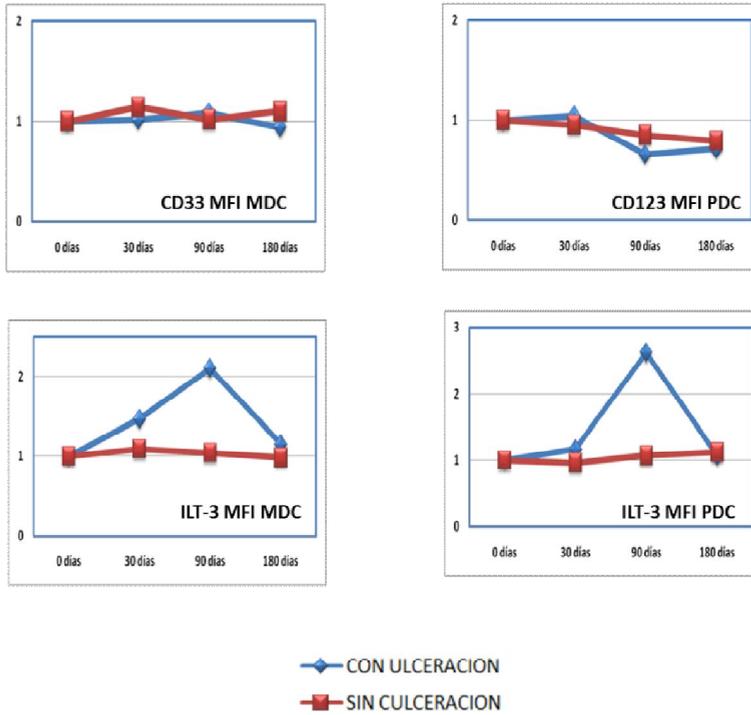
**Figura 8A.-** Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las poblaciones leucocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B y Células NK en pacientes con melanoma clasificados según presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario.

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 8B** Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Tc y Treg) y poblaciones de células dendríticas (MDC y PDC) en pacientes con melanoma clasificados según presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario.

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 8C.-**Estudio de las variaciones del Ratio de la Intensidad Media de Fluorescencia de los marcadores CD33 e ILT-3 en la población MDC Y CD123 e ILT-3 en la población PDC en pacientes con melanoma clasificados según presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario

**6.2.4 Estudio de las variaciones durante el tratamiento en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según presencia o ausencia de respuesta inmunitaria reactiva (vitiligo y/o anticuerpos autoinmunitarios).**

El tratamiento con interferón de un melanoma de alto riesgo puede inducir la aparición de respuestas de autoinmunidad, como el vitiligo y este fenómeno es considerado como un indicador independiente de buen pronóstico a la terapéutica con interferón, relacionado con la posible respuesta del Sistema Inmunitario. La respuesta humoral asociada a la autoinmunidad se manifiesta por la presencia de títulos elevados de autoanticuerpos(antimicrosomiales y anti-tiroideos).

En nuestro grupo de pacientes con melanoma, la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos o vitiligo en el grupo de pacientes estudiados estuvo presente en 7 de los 18 pacientes que terminaron el tratamiento. De acuerdo con esta observación, se han clasificado los pacientes de nuestro estudio en dos grupos, según hayan manifestado o no una respuesta de tipo autoinmunitario. La comparación del efecto del tratamiento en ambos grupos se presenta en las Tablas 7a y 7b.

Como se puede comprobar en dichas Tablas, las únicas diferencias importantes entre los dos grupos de pacientes antes del tratamiento se observan en los linfocitos B y en los linfocitos Treg. Así, en los pacientes sin respuesta autoinmunitaria, los linfocitos B se encuentran notablemente disminuidos (Tabla 7a). Por el contrario, los linfocitos Treg se encuentran muy aumentados en este grupo de pacientes (Tabla 7b).

Las variaciones de las subpoblaciones inmunitarias a lo largo del tratamiento se muestran en las Figuras 9a-9c, con los datos de números absolutos transformados en ratios con respecto al valor basal pretratamiento, como se ha realizado en las comparaciones anteriores. En los subgrupos definidos por la presencia o ausencia de respuesta inmunitaria, no se observaron diferencias apreciables en la evolución de la gran mayoría de las subpoblaciones inmunitarias a lo largo del tratamiento. Sólo en las poblaciones de linfocitos B y linfocitos Treg (que ya mostraban diferencias antes del tratamiento) y en los linfocitos Th2 se encontraron diferencias en el patrón de cambios. Los linfocitos B disminuyeron de forma más marcada y desde el día 30 de tratamiento en los pacientes con respuesta inmunitaria (Figura 9A). Un patrón opuesto se observó en los linfocitos Treg, en los que el tratamiento indujo un descenso marcado (y una ligera tendencia final a la recuperación) en los pacientes sin respuesta autoinmune, mientras que en los pacientes con respuesta inmunitaria, se observa un marcado aumento a partir del día 90 de tratamiento. Los linfocitos Th2, por su parte, siguen el mismo patrón de descenso relativo que los linfocitos totales, linfocitos T, linfocitos Th2 y linfocitos Tc en los pacientes sin respuesta inmunitaria, pero en los pacientes con respuesta inmunitaria detectada, esta subpoblación aumenta a partir del día 90 (Figura 9B).

La Figura 9c, referida a la evolución de los marcadores específicos de células dendríticas, muestra que se producen marcadas diferencias entre los grupos de pacientes con respecto a la intensidad de expresión de la proteína tolerogénica ILT-3 tanto en células dendríticas mieloides como plasmocitoides. En ambas subpoblaciones, ILT-3 aumenta marcadamente durante el tratamiento, de forma más precoz en

Resultados y desarrollo argumental

las células dendríticas mieloides, para volver al nivel basal a los 180 días de tratamiento en ambos grupos de pacientes.

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 7a VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (PRESENCIA O AUSENCIA DE RESPUESTA INMUNE A LO LARGO DEL ESTUDIO)</b> |                     |                     |                     |                     |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Media <math>\pm</math> Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b>   |                     |                     |                     |                     |
|   | <b>DIA 0</b>        | <b>DIA 30</b>       | <b>DIA 90</b>       | <b>DIA 180</b>      |
| <b><u>Leucocitos</u></b>  |                     |                     |                     |                     |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 6606 $\pm$ 1234.3   | 4939.1 $\pm$ 4719.1 | 4704.9 $\pm$ 2106.3 | 4032.2 $\pm$ 1502.6 |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 7497.9 $\pm$ 2523.6 | 5985.1 $\pm$ 2731.6 | 5116.5 $\pm$ 1920.4 | 6572.7 $\pm$ 4177.2 |
| <b><u>Linfocitos</u></b>  |                     |                     |                     |                     |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 2379.2 $\pm$ 1313.4 | 1404.2 $\pm$ 571.3* | 1113.0 $\pm$ 374.4  | 1315.2 $\pm$ 728.9  |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 2428.3 $\pm$ 1418.7 | 1966.5 $\pm$ 1143.7 | 1227.8 $\pm$ 356.7  | 1858.2 $\pm$ 667.4  |
| <b><u>Linfocitos T</u></b>  |                     |                     |                     |                     |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 1578 $\pm$ 4813     | 1168.3 $\pm$ 528.9* | 721.9 $\pm$ 217.7   | 1181.9 $\pm$ 669.6  |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 1577 $\pm$ 1022     | 1334.3 $\pm$ 832.4  | 770.7 $\pm$ 354.5   | 1241.8 $\pm$ 806.11 |
| <b><u>Linfocitos B</u></b>  |                     |                     |                     |                     |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 424.9 $\pm$ 484.6   | 107.7 $\pm$ 77      | 108.4 $\pm$ 1.8     | 164.8 $\pm$ 101.1   |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 240.8 $\pm$ 173.3   | 278.1 $\pm$ 314.1   | 137.0 $\pm$ 108.3   | 202.3 $\pm$ 91.2    |
| <b><u>Células NK</u></b>  |                     |                     |                     |                     |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 306.2 $\pm$ 258.7   | 151.7 $\pm$ 138.9   | 124.2 $\pm$ 119.8   | 203.13 $\pm$ 227.5  |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 367.7 $\pm$ 264.1   | 325.3 $\pm$ 318.9   | 148.8 $\pm$ 117     | 296.8 $\pm$ 217.6   |

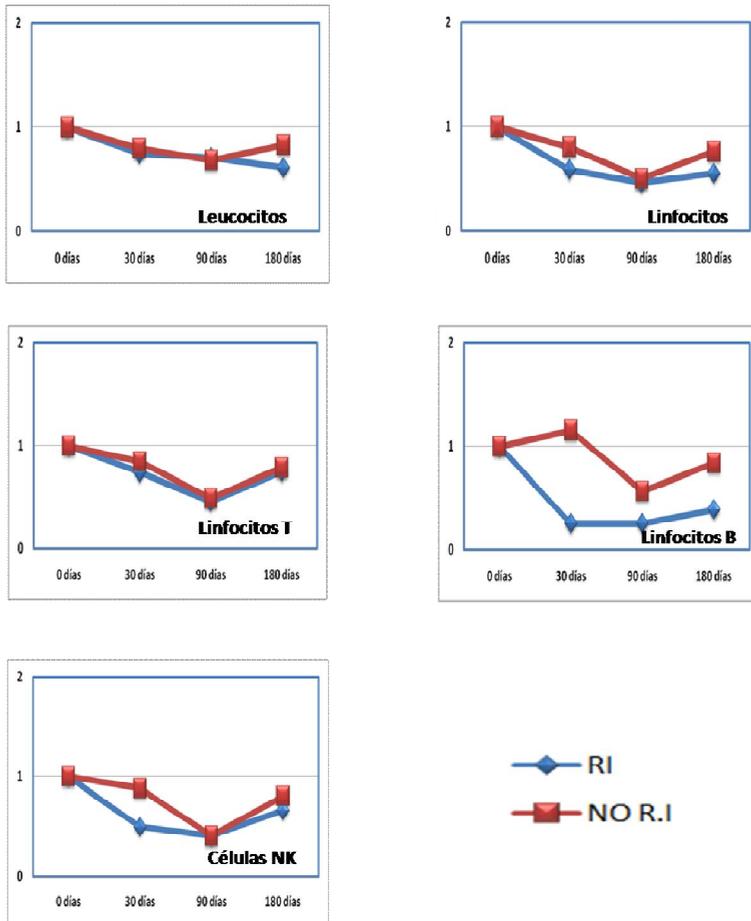
\*p $\leq$ 0,05 diferencias significativas

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 7b VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (PRESENCIA O AUSENCIA DE RESPUESTA INMUNE A LO LARGO DEL ESTUDIO)</b> |                   |                              |                              |                             |
|---|-------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| <b>Media <math>\pm</math> Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b>   |                   |                              |                              |                             |
|   | <b>DIA 0</b>      | <b>DIA 30</b>                | <b>DIA 60</b>                | <b>DIA 180</b>              |
| <b><u>Linfocitos Th1</u></b>  |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 964.9 $\pm$ 325.3 | 699.1 $\pm$ 298.2            | 552.0 $\pm$ 190.5            | 666.7 $\pm$ 305.1           |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 979.8 $\pm$ 827.8 | 834.0 $\pm$ 414.9            | 534.2 $\pm$ 154.2            | 761.3 $\pm$ 629.9           |
| <b><u>Linfocitos Th2</u></b>  |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 46.8 $\pm$ 29.6   | 34.5 $\pm$ 33.1 <sup>*</sup> | 10.8 $\pm$ 8.1               | 10.2 $\pm$ 12.8             |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 27.5 $\pm$ 18.6   | 32.6 $\pm$ 33.9              | 20.8 $\pm$ 10.3              | 34.4 $\pm$ 34.5             |
| <b><u>Linfocitos Tc</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 543.8 $\pm$ 239.5 | 336.1 $\pm$ 155.3            | 344.2 $\pm$ 209.2            | 360.8 $\pm$ 246             |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 540.8 $\pm$ 330.0 | 537.2 $\pm$ 395.6            | 341.6 $\pm$ 184.9            | 380.6 $\pm$ 235.9           |
| <b><u>Linfocitos Treg</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 29.3 $\pm$ 20.3   | 31.1 $\pm$ 28.2              | 25.2 $\pm$ 17.8              | 50.7 $\pm$ 29.7             |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 45.25 $\pm$ 31.12 | 39.9 $\pm$ 17.7              | 14.8 $\pm$ 12.3 <sup>*</sup> | 23.5 $\pm$ 8.5 <sup>‡</sup> |
| <b><u>MDC</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 8.6 $\pm$ 5.1     | 8.7 $\pm$ 3.4                | 6.4 $\pm$ 6.2                | 4.6 $\pm$ 1.4               |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 11,8 $\pm$ 5.8    | 11,7 $\pm$ 6.1               | 9.4 $\pm$ 6.6                | 8.6 $\pm$ 5.1               |
| <b><u>PDC</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 12.6 $\pm$ 6.1    | 6.9 $\pm$ 4.7                | 7.3 $\pm$ 5.1                | 5.4 $\pm$ 1.2               |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 11,5 $\pm$ 10.7   | 7.2 $\pm$ 5.1                | 7.1 $\pm$ 5.5                | 7.1 $\pm$ 5.7 <sup>‡</sup>  |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS (Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias)</b>                 |                   |                              |                              |                             |
| <b><u>MDC MFI CD33</u></b>  |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 6.7 $\pm$ 4.4     | 6.2 $\pm$ 5.5                | 6.4 $\pm$ 3.0                | 4.5 $\pm$ 3.4               |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 8.2 $\pm$ 2.4     | 8.9 $\pm$ 2.7                | 8.8 $\pm$ 3.0                | 9.7 $\pm$ 2.7               |
| <b><u>PDC MFI CD123</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 8.5 $\pm$ 1.9     | 8.6 $\pm$ 1.7                | 6.9 $\pm$ 1.3                | 8.1 $\pm$ 3.6               |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 9.7 $\pm$ 4.8     | 9.5 $\pm$ 4.3                | 6.9 $\pm$ 2.0                | 6.9 $\pm$ 2.7               |
| <b><u>MDC MFI ILT-3</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 3.4 $\pm$ 1.9     | 7.7 $\pm$ 6.4                | 8.2 $\pm$ 6.9                | 4.4 $\pm$ 1.8               |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 4.9 $\pm$ 2.9     | 4.9 $\pm$ 1.9                | 6.7 $\pm$ 2.5                | 4.6 $\pm$ 1.4               |
| <b><u>PDC MFI ILT-3</u></b>   |                   |                              |                              |                             |
| <b>CON RESPUESTA</b>  | 5.7 $\pm$ 4.6     | 5.7 $\pm$ 2.8                | 17.9 $\pm$ 15                | 5.7 $\pm$ 0.9               |
| <b>SIN RESPUESTA</b>  | 5.5 $\pm$ 3.5     | 6.4 $\pm$ 3.7                | 7.4 $\pm$ 1.5                | 5.5 $\pm$ 2.7               |

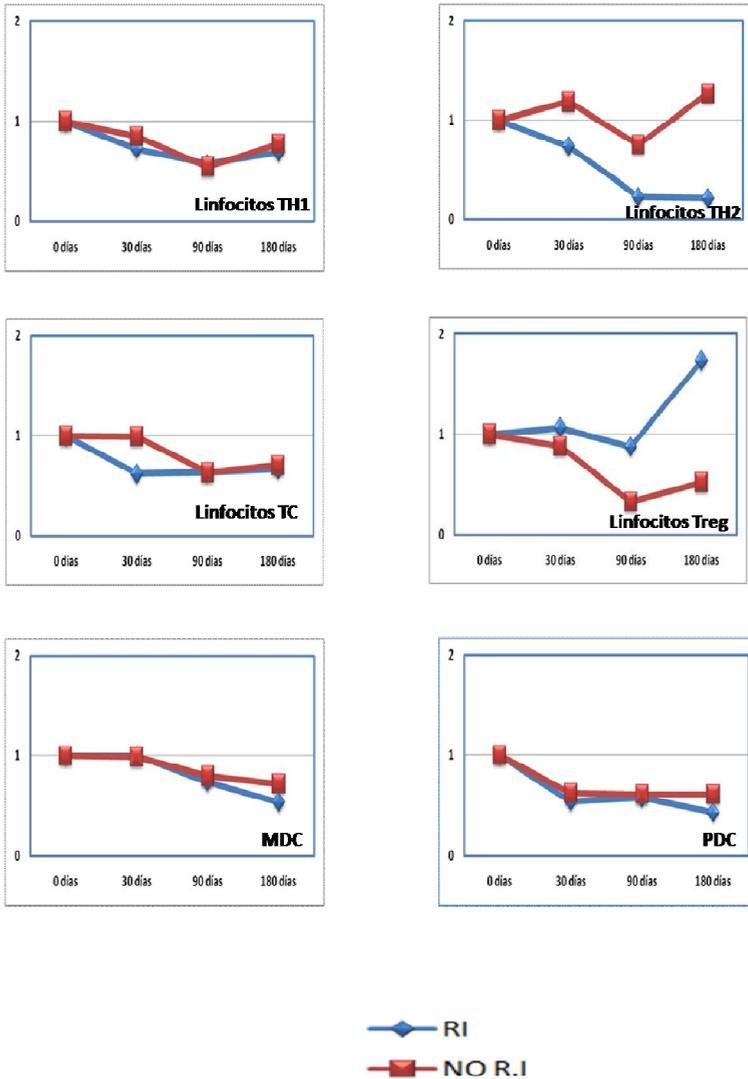
\*p $\leq$ 0,05 diferencias significativas (muestra basal); <sup>‡</sup>p $\leq$ 0,05 diferencias significativas (entre grupos)

Resultados y desarrollo argumental



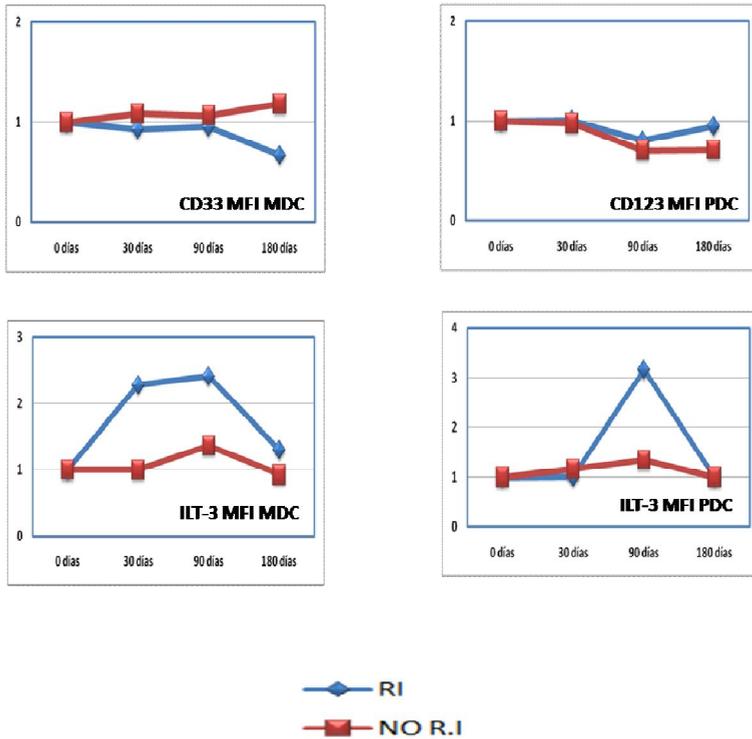
**Figura 9A.-** Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las poblaciones leucocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B y Células NK en pacientes con melanoma clasificados según presencia o ausencia de respuesta inmune.

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 9B.**-Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Tc y Treg) y poblaciones de células dendríticas ( MDC y PDC) en pacientes con melanoma clasificados según presencia o ausencia de de respuesta inmune.

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 9C.**-Estudio de las variaciones del Ratio de la Intensidad Media de Fluorescencia de los marcadores CD33 e ILT-3 en la población MDC Y CD123 e ILT-3 en la población PDC en pacientes con melanoma clasificados según presencia o ausencia de respuesta inmune.

**6.2.5 Estudio de las variaciones durante la fase de inducción en el grupo de pacientes con melanoma de alto riesgo clasificados según presencia o ausencia de recidiva.**

La reincidencia del melanoma tras el tratamiento puede aparecer a nivel local o a distancia. El riesgo de recidiva del melanoma primario aumenta con el espesor del tumor, la presencia de ulceración en el mismo y la presencia de satélites cerca del tumor primario.

Durante el periodo en el que se realizó este estudio 5 de los 25 pacientes iniciales recayeron y no pudieron completar las fases del tratamiento. Por dicha razón, hemos realizado un estudio comparativo limitado de este grupo de pacientes con respecto al grupo sin recidiva, con datos obtenidos antes del inicio del tratamiento y en el día 30 del mismo. Los resultados del análisis de las poblaciones inmunitarias se muestran en las Tablas 8a y 8b.

Como se puede comprobar en dichas Tablas, las únicas diferencias importantes entre los dos grupos de pacientes antes del tratamiento se observan en los linfocitos B y en los linfocitos Treg. Así, en los pacientes con recidiva, tanto los linfocitos B como los linfocitos Treg se encuentran notablemente aumentados en condiciones basales.

Las variaciones de las subpoblaciones inmunitarias a lo largo del tratamiento se muestran en las Figuras 10A-10C, con los datos de números absolutos transformados en ratios con respecto al valor basal pretratamiento, como en las gráficas previamente mostradas. En los subgrupos definidos por la presencia o ausencia de recaída, no se observaron diferencias apreciables en la evolución de la gran mayoría de las subpoblaciones inmunitarias a lo largo del tratamiento. Sólo en las poblaciones de células NK y de linfocitos Treg se encontraron

### Resultados y desarrollo argumental

diferencias en el patrón de cambios. Las células NK disminuyeron de forma más marcada en los pacientes con recidiva (Figura 10A). En cuanto a los linfocitos Treg, se detectó un patrón opuesto de evolución, ya que el tratamiento indujo un aumento marcado en los pacientes con recidiva (Figura 10B). Por último, las variaciones relativas de la expresión de ILT-3 en las células dendríticas plasmocitoides tuvieron un patrón opuesto en los pacientes con recidiva (disminución a los 30 días) y en los pacientes sin recaída (aumento relativo a los 30 días).

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 8a VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES<br/>                     CELULARES<br/>                     (PRESENCIA O AUSENCIA DE RECIDIVAS A LOS 30 DIAS)<br/>                     Media <math>\pm</math> Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b> |                                |                                 |
|---|--------------------------------|---------------------------------|
|   | <b>DIA 0</b>                   | <b>DIA 30</b>                   |
|   | <b><u>Leucocitos</u></b>       |                                 |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 6316 $\pm$ 934.2               | 5000 $\pm$ 1848                 |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 7483.9 $\pm$ 2330.             | 5763.1 $\pm$ 3538.4             |
|   | <b><u>Linfocitos</u></b>       |                                 |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 2541.7 $\pm$ 1844              | 1604.5 $\pm$ 385.7              |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 2414.7 $\pm$ 1252              | 1849.5 $\pm$ 1059               |
|   | <b><u>Linfocitos T</u></b>     |                                 |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 1417.5 $\pm$ 856.2             | 712.7 $\pm$ 147.1               |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 1674.1 $\pm$ 863.3             | 843.1 $\pm$ 408.9               |
|   | <b><u>Linfocitos B</u></b>     |                                 |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 544.8 $\pm$ 584.9 <sup>‡</sup> | 309.12 $\pm$ 407.1 <sup>‡</sup> |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 268.6 $\pm$ 146.1              | 175.8 $\pm$ 147.8               |
|   | <b><u>Células NK</u></b>       |                                 |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 279.7 $\pm$ 312.6              | 159.7 $\pm$ 66.1                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 325.8 $\pm$ 248.7              | 282.7 $\pm$ 289.1               |

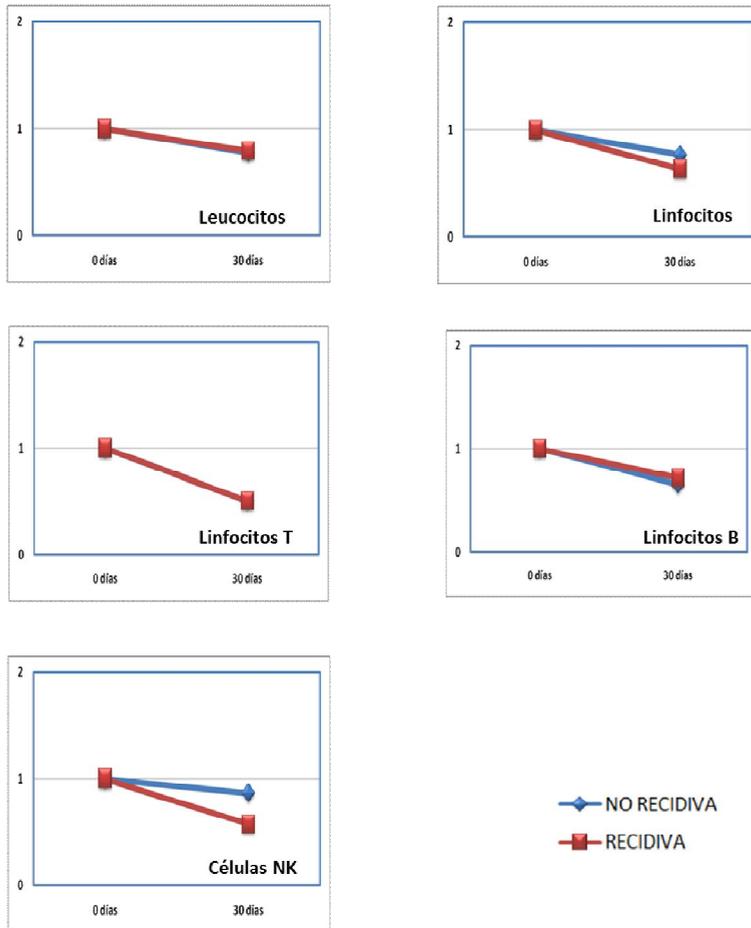
\*p $\leq$ 0,05 diferencias significativas (muestra basal); <sup>‡</sup> p $\leq$ 0,05 diferencias significativas (entre grupos)

Resultados y desarrollo argumental

| <b>Tabla 8b VALORES ABSOLUTOS DE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES CELULARES (PRESENCIA O AUSENCIA DE RECIDIVAS A LOS 30 DIAS) Media ± Desviación Estándar (células /<math>\mu</math>l).</b> |                               |                              |
|---|-------------------------------|------------------------------|
|   | <b>DIA 0</b>                  | <b>DIA 30</b>                |
|   | <u><i>Linfocitos Th1</i></u>  |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 818 $\pm$ 482                 | 694 $\pm$ 147                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 1039 $\pm$ 700                | 810 $\pm$ 410                |
|   | <u><i>Linfocitos Th2</i></u>  |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 40.8 $\pm$ 18.7               | 33.6 $\pm$ 35.6              |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 36.2 $\pm$ 25.4               | 34.8 $\pm$ 33,3              |
|   | <u><i>Linfocitos Tc</i></u>   |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 541,4 $\pm$ 382.3             | 504,7 $\pm$ 351              |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 578.1 $\pm$ 273.9             | 487,8 $\pm$ 351              |
|   | <u><i>Linfocitos Treg</i></u> |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 25.9 $\pm$ 17.7 <sup>*</sup>  | 35.9 $\pm$ 21.6 <sup>†</sup> |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 45.7 $\pm$ 30.8               | 40.3 $\pm$ 20.69             |
|   | <u><i>MDC</i></u>             |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 13.1 $\pm$ 2.52               | 9.9 $\pm$ 6.4                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 10.0 $\pm$ 5.4                | 10.5 $\pm$ 4.9               |
|   | <u><i>PDC</i></u>             |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 13.8 $\pm$ 11.4               | 3.7 $\pm$ 1.8                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 11.6 $\pm$ 10.6               | 8.0 $\pm$ 4.8 <sup>†</sup>   |
| <b>INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE MARCADORES EN CELULAS DENDRITICAS (Intensidad Media de Fluorescencia, Unidades arbitrarias)</b>   |                               |                              |
|   | <u><i>MDC MFI CD33</i></u>    |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 7.5 $\pm$ 3.2                 | 7.1 $\pm$ 4.8                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 7.5 $\pm$ 3.2                 | 8.2 $\pm$ 4.8                |
|   | <u><i>MDC MFI CD123</i></u>   |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 10.5 $\pm$ 5.6                | 11.1 $\pm$ 3.9               |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 9.4 $\pm$ 3.5                 | 9.4 $\pm$ 3.7                |
|   | <u><i>MDC MFI ILT-3</i></u>   |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 4.3 $\pm$ 2.7                 | 8.4 $\pm$ 6.5                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 4.2 $\pm$ 1.9                 | 5.4 $\pm$ 3.2                |
|   | <u><i>PDC MFI ILT-3</i></u>   |                              |
| <b>CON RECIDIVA</b>   | 8.4 $\pm$ 5.2                 | 6.7 $\pm$ 2.9                |
| <b>SIN RECIDIVA</b>   | 4.8 $\pm$ 2.6                 | 6.0 $\pm$ 3.4                |

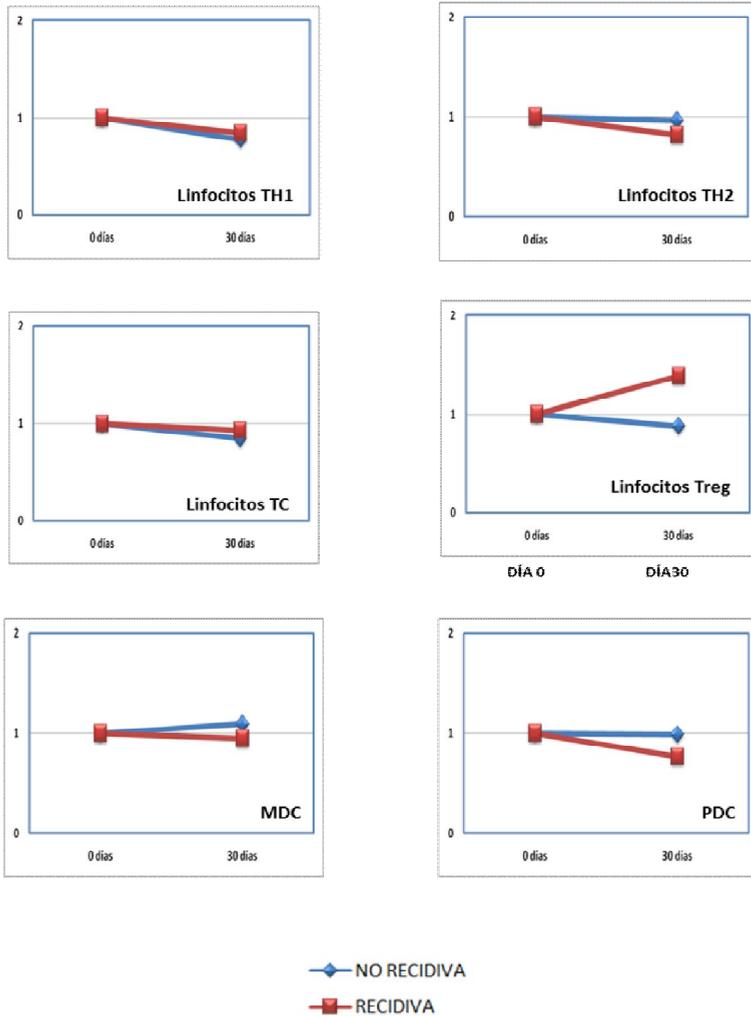
\*p $\leq$ 0,05 diferencias significativas (muestra basal); <sup>†</sup>p $\leq$ 0,05 diferencias significativas (entre grupos)

Resultados y desarrollo argumental

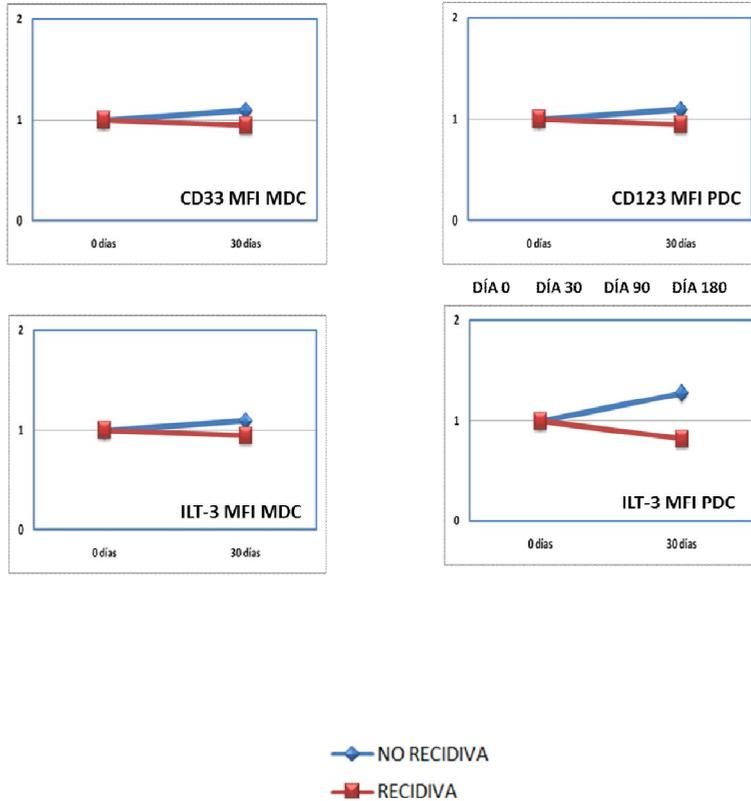


**Figura 10A.-** Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las poblaciones leucocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B y Células NK en pacientes con melanoma clasificados con o sin recidiva a lo largo de tratamiento

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 10B.**-Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Tc y Treg) y poblaciones de células dendríticas.( MDC y PDC) en pacientes con melanoma clasificados con o sin recidiva a lo largo de tratamiento



**Figura 10C.-** Estudio de las variaciones del Ratio de la Intensidad Media de Fluorescencia de los marcadores CD33 e ILT-3 en la población MDC Y CD123 e ILT-3 en la población PDC en pacientes con melanoma clasificados con o sin recidiva a lo largo de tratamiento

### **6.2.6 . Relevancia biológica y/o clínica de los resultados.**

Tras haber caracterizado el estado basal de las principales poblaciones inmunitarias en los pacientes de melanoma, tanto en el grupo total, como en los diferentes estadios, se ha comparado el estado inmunitario del grupo de pacientes con melanoma al diagnóstico y en diferentes puntos temporales del tratamiento con alta dosis de Interferón- $\alpha$ . El número absoluto de leucocitos disminuye de forma progresiva durante el tratamiento, pero retorna a un nivel normal en el día 180. La mayoría de poblaciones de células inmunitarias analizadas siguen el mismo patrón de variación temporal, con excepción de los linfocitos Th2, que no se modifican, y los linfocitos Tc y las células dendríticas, que disminuyen progresivamente y no tienden a la recuperación a los 180 días del tratamiento. Estas observaciones demuestran efectos específicos del tratamiento en algunas subpoblaciones inmunitarias de relevancia.

El melanoma es un tumor considerado inmunogénico, por lo que las células del sistema inmune localizadas en la piel deberían de reconocer las células tumorales y destruirlas. Uno de los mecanismos de escape que está descrito en el melanoma (Viguiet et al., 2004) es el aumento de células Treg, por el que se crearía tolerancia y provocaría una disminución de la actividad citotóxica contra las células del tumor. En nuestros resultados debemos destacar que en la muestra basal del melanoma con respecto a individuos sanos existe un aumento significativo del número absoluto de linfocitos Treg, y que este valor en pacientes tratados disminuye durante los primeros 90 días, pese a lo cual no se observa un aumento de linfocitos Tc sino un descenso.

Para evaluar con precisión este efecto, hemos realizado un análisis del cociente Th/Tc(Figura 11), ya que el descenso puede estar enmascarado por la disminución de la población de leucocitos en general. El resultado de este cálculo indirecto muestra que, en realidad, existe un aumento de linfocitos Tc con respecto a los Th, efecto esperable en el tratamiento con Interferón- $\alpha$  .

Se ha realizado, además, un estudio estadístico para comparar los cambios inmunitarios inducidos por el tratamiento ente subgrupos de pacientes estratificados por el estadio al diagnóstico; presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario; presencia o ausencia de recidiva durante la fase de inducción y presencia o ausencia de respuesta inmunitaria reactiva. Las diferentes comparaciones muestran resultados muy complejos pero en general se observan ciertas tendencias.

En los pacientes de Estadio III con respecto a los del Estadio II, el tratamiento tiende a disminuir las poblaciones celulares relacionadas con la respuesta defensiva celular, aumentando los linfocitos Th2 y la expresión de la molécula tolerogénica ILT-3 en células dendríticas. Se observa que el efecto del tratamiento en las poblaciones leucocitarias estudiadas de los pacientes con melanoma en Estadio III es mayor e, incluso, el efecto es más prolongado que en los pacientes en Estadio II.

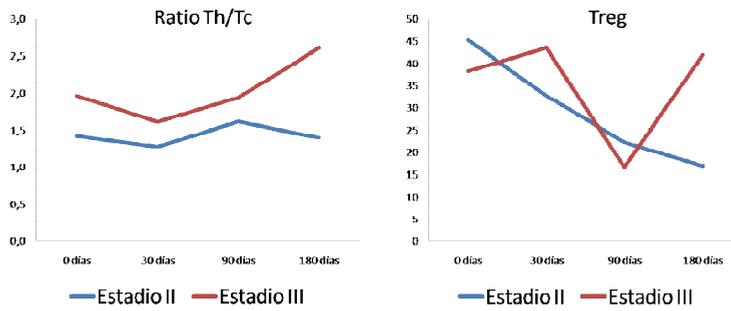
Con respecto a la presencia de ulceración, se observa que en los pacientes con melanoma ulcerado con respecto a los no ulcerados, el tratamiento tiende a disminuir marcadamente las células Treg y las células dendríticas plasmocitoides, indicando un menor grado de inhibición de las respuestas protectoras de tipo celular.

En los pacientes con respuesta inmunitaria reactiva (sobre todo por anticuerpos) con respecto a los pacientes sin respuesta, el

tratamiento tiende a disminuir marcadamente los linfocitos B, los linfocitos Th2 y las células Treg y las células dendríticas plasmocitoides, con un aumento de la molécula tolerogénica ILT-3 en todas las poblaciones de células dendríticas. Hay que destacar que en los pacientes donde hay respuesta inmune, el cociente Th/TC aumenta (Figura 11) y la respuesta inmune en estos pacientes se ha detectado mediante el aumento de anticuerpos en su mayoría. La síntesis de inmunoglobulinas se produce por la interacción entre los linfocitos T helper y las células B, siendo un dato importante a la hora de evaluar la respuesta inmune de los pacientes con melanoma.

Sorprendentemente, no se encontraron apenas diferencias entre los pacientes con recidiva y los que no recayeron, posiblemente debido a que sólo se pudo estudiar el punto temporal de 30 días.

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 11.-** Evolución del Ratio Th/TC y de las Treg durante el tratamiento con INF- $\alpha$ 2b.

### **6.3 Aplicación de la estrategia bioinformática del análisis de clústers jerárquicos para integrar los parámetros de poblaciones inmunitarias con los principales parámetros clínicos de los pacientes.**

En el presente estudio, se han determinado hasta 18 parámetros de relevancia inmunitaria en leucocitos de sangre periférica de pacientes con melanoma y en un grupo de donantes sanos. Los parámetros citométricos obtenidos mediante el inmunofenotipaje de superficie han permitido calcular los números absolutos y los porcentajes relativos (no mostrados aquí por innecesariamente redundantes) de las poblaciones de leucocitos totales, linfocitos totales, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos Th1, linfocitos Th2, linfocitos Treg, células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmocitoides, así como cuantificar la intensidad de expresión de las moléculas reguladoras CD33, CD123 e ILT-3 en la membrana plasmática de las correspondientes células dendríticas. Por otra parte, nuestra base de datos con las historias clínicas de los pacientes, incluye datos clínicos de relevancia en el diagnóstico y pronóstico del melanoma, incluyendo el índice de Breslow, el número de mitosis/mm<sup>2</sup>, la presencia o ausencia de ulceración, la elevación del título de anticuerpos anti-melanocíticos, la presencia de vitíligo y la recaída.

En este tipo de estudios translacionales, los aspectos biológicos de la patología de estudio, obtenidos en el laboratorio de investigación básica, complementan la información médica, obtenida en la exploración del paciente o el análisis de sus células o tejidos en el laboratorio de rutina clínica. La integración de ambos tipos de información para generar un conocimiento útil al diagnóstico,

pronóstico o tratamiento de los pacientes requiere casi siempre de un potente estudio estadístico de correlación.

Los métodos estadísticos multivariantes y el análisis multivariante son herramientas estadísticas que estudian el comportamiento simultáneo de múltiples variables. Son necesarias Se usan principalmente para comprender la relación entre varios grupos de variables, para identificar y suprimir las variables no representativas, simplificando así los modelos estadísticos excesivamente complejos. Algunos de los métodos más conocidos y utilizados son la regresión lineal y el análisis discriminante. Aunque existen diferentes modelos y métodos, los más frecuentes tratamientos estadísticos en estudios como el nuestro se basan en métodos de dependencia, desde los más sencillos, como el estudio de la regresión hasta los más complejos, como el análisis discriminante o el análisis multivariante de la varianza.

La naturaleza especial de nuestro estudio deriva de un paradigma biomédico muy importante, como es la fuerte interacción entre el Sistema Inmunitario y el melanoma. El melanoma es un tumor con capacidad inmunogénico pero que, al mismo tiempo, evade al Sistema Inmunitario, diseminándose principalmente por vía linfática y mostrando gran capacidad de metástasis. El microambiente tumoral es capaz, además, de modular la eficacia de las respuestas inmunitarias específicas. Nuestro grupo ha investigado repetidamente esta unidad entre el melanoma y la respuesta inmunitaria local o general (Botella-Estrada et al., 2014).

Por estas razones, nos ha parecido más adecuado aplicar un análisis multivariante basado en un método de interdependencia entre variables, como es el Análisis de Clústers Jerárquicos (ACJ), una

herramienta esencial de la Bioinformática moderna. El AJC es muy utilizado en estudios de Genómica y Proteómica y empieza ahora a ser aplicado al análisis de datos en Citómica (Lugli et al., 2007). El ACJ es una herramienta estadística diseñada para poner de manifiesto las agrupaciones naturales (o clústers) dentro de un conjunto de datos, que de otra forma, no serían evidentes. Los objetos en ACJ pueden ser casos o variables, dependiendo de si se desea clasificar casos o examinar relaciones entre las variables.

El ACJ comienza separando cada objeto en un *clúster* por sí mismo. En cada etapa del análisis, el criterio por el que los objetos son separados hace menos estricto, para poder unir clústers más similares, hasta que todos los objetos puedan ser agrupados en un árbol de clasificación completo. El criterio básico para cualquier agrupación es la distancia estadística. Los objetos que estén cerca uno del otro pertenecerían al mismo clúster, y los objetos que estén lejos uno del otro pertenecerán a distintos clústers. La medida define el método de cálculo de la distancia. Por ejemplo, la medida de distancia Euclídea calcula la distancia como una línea recta entre dos clústers. Las medidas de intervalo asumen que las variables están medidas en escala; las medidas de conteo asumen que son números discretos, y las medidas binarias asumen que toman dos valores. La estandarización permite igualar el peso de las variables medidas sobre diferentes escalas. De esta forma, se puede clasificar una población de individuos o variables en un número pequeño de grupos de forma que las observaciones pertenecientes a un grupo sean muy similares entre sí y muy diferentes del resto. A diferencia del análisis discriminante, se desconoce, a priori, el número y la composición de dichos grupos.

### **6.3.1 Clasificación de pacientes aplicando el método multivariante de Análisis de Clústers Jerárquicos**

Para realizar el ACJ de nuestro conjunto de datos inmunológicos y clínicos se han incluido los valores obtenidos del análisis citométrico de las poblaciones inmunitarias estudiadas. El primer objetivo de nuestra aproximación bioinformática es el de establecer una clasificación predictiva de los pacientes durante la fase de inducción del tratamiento, para intentar encontrar grupos de pacientes que presenten mejor o peor respuesta al final del tratamiento.

La Figura 12 muestra los resultados de la aplicación del ACJ a nuestro conjunto de datos citométricos. Para normalizar los valores, se ha calculado la diferencia entre los valores determinados a los 30 días y los valores basales, determinados previamente al tratamiento. Los datos obtenidos se han procesado con el Programa Cluster 3.0 aplicando un método no supervisado y el resultado se ha visualiza en forma de cluster con ayuda del programa Treeview.

Como se puede observar en la Figura 12, el AJC define tres grupos de pacientes en función de las variaciones inducidas por el tratamiento inicial. Estos grupos se caracterizan de la siguiente manera:

Grupo 1: no se observan grandes cambios fenotípicos en las poblaciones inmunitarias ni en los marcadores de células dendríticas tras la primera fase de tratamiento.

Grupo 2: este clúster se caracteriza principalmente por la disminución tras el tratamiento del número absoluto de linfocitos Th2, linfocitos Treg, células dendríticas mieloides y plasmocitoides y de la expresión de marcadores de expresión en células dendríticas.

Grupo 3: este clúster se caracteriza por un discreto aumento tras el tratamiento del número absoluto de linfocitos Th2, linfocitos Treg, células dendríticas mieloides y plasmocitoides y de la expresión de marcadores de expresión en células dendríticas.

Al realizar el análisis estadístico de cada grupo para la muestra del fenotipo realizada a día 30 y 90 se observa que el grupo 1 y el grupo 2 sufren más cambios a nivel fenotípico que el grupo 3. (Figuras 12-14).

En la muestra basal se observa para los tres grupos muestra diferencias con respecto al número absoluto de las células NK y células B siendo en los grupos 2 y 3 superiores que en grupo 1, a los 30 y 90 días de iniciar el tratamiento se puede observar que ambas poblaciones responden al tratamiento disminuyendo su número en los tres grupos, pero en el grupo 3 este descenso es menor que en los otros dos grupos.

En cuanto al número de linfocitos Th y Tc es mayor en el Grupo 2, comparándolos con los otros dos grupos, e incluso se puede observar que durante el tratamiento con INF- $\alpha$ 2b el comportamiento del grupo 1 y 2 es similar hay un descenso de las poblaciones, sin embargo en el grupo 3 aumentan.

Las células Th2 y Treg en el Grupo 1 y 2 disminuyen a los 30 días, mientras que, por el contrario, esta subpoblación aumenta en el Grupo 3 aumentan.

En la muestra basal las células dendríticas MDC se encuentran aumentadas en el Grupo 2 y Grupo 3. En el análisis de las PDC solamente se encuentran aumentadas en el Grupo 2. En respuesta al tratamiento bajan las poblaciones de células dendríticas en el Grupo 1 y Grupo 2, mientras que en el Grupo 3 aumenta las MDC y las PDC se mantienen.

En el análisis de los parámetros clínicos de los pacientes se observa un aumento del número de mitosis asociadas al tumor primario, el grosor del tumor valor indicado por el índice de Breslow aumenta del Grupo 1 al Grupo 3, indicando un mayor grado de malignidad en el Grupo 3.

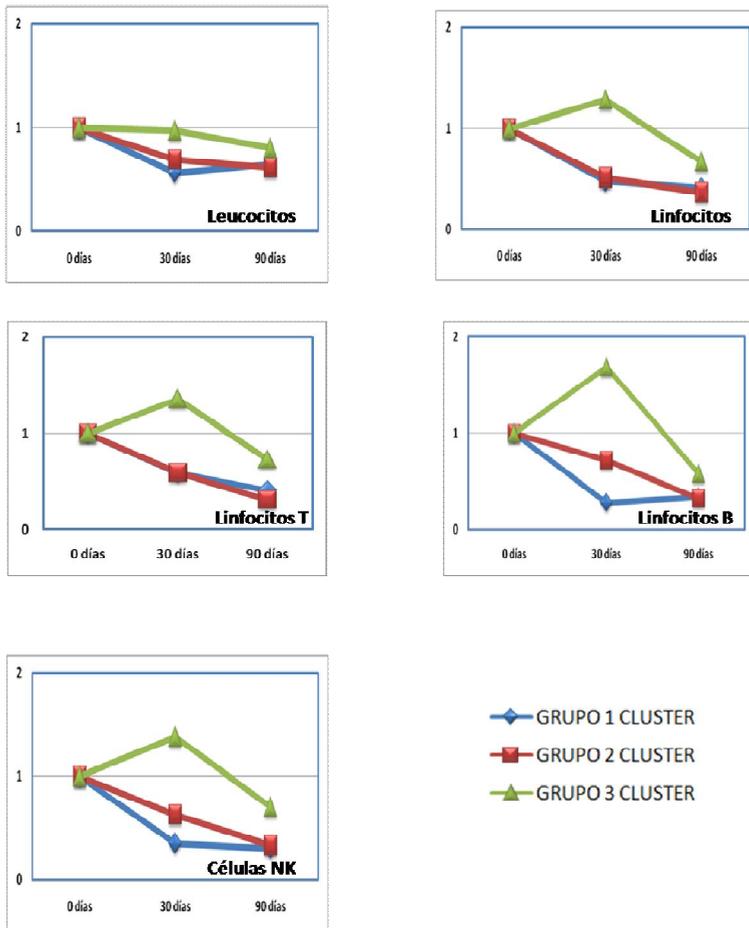
El mayor porcentaje de respuesta inmunológica mediada por anticuerpos corresponde con el Grupo 2. En cuanto a la recaída, el Grupo 3 es el que presenta más recaídas mientras que el grupo 1 presenta menos recaídas.

Los datos clínicos y el análisis de las poblaciones leucocitarias sugieren que aquellos pacientes que poseen mayor grado de malignidad tiene más células NK y B como ya hemos descrito en los apartados anteriores, en la muestra basal.

En la búsqueda de marcadores que nos puedan indicar si hay respuesta o no al tratamiento hemos observado que las principales poblaciones a tener en cuenta son las Treg y las MDC tolerogénicas ya que estas aumentan en los pacientes con menor respuesta y peor pronóstico, posiblemente se produzca un mecanismo de escape tumoral en este grupo en presencia del IFN- $\alpha$ .

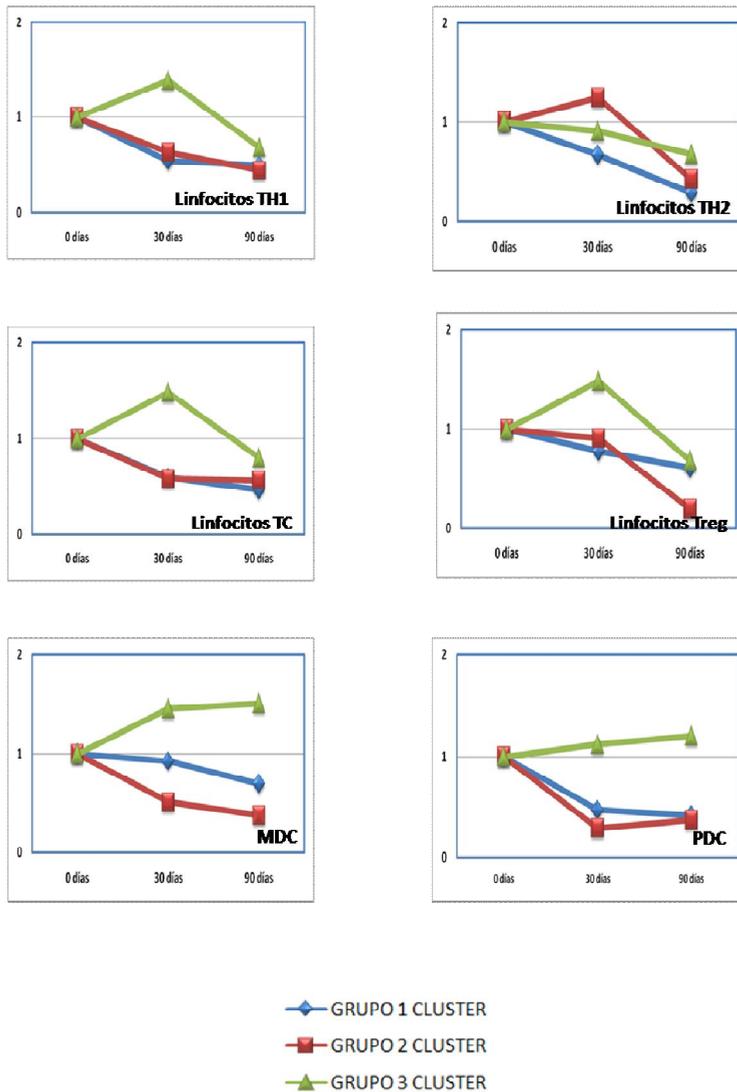


Resultados y desarrollo argumental

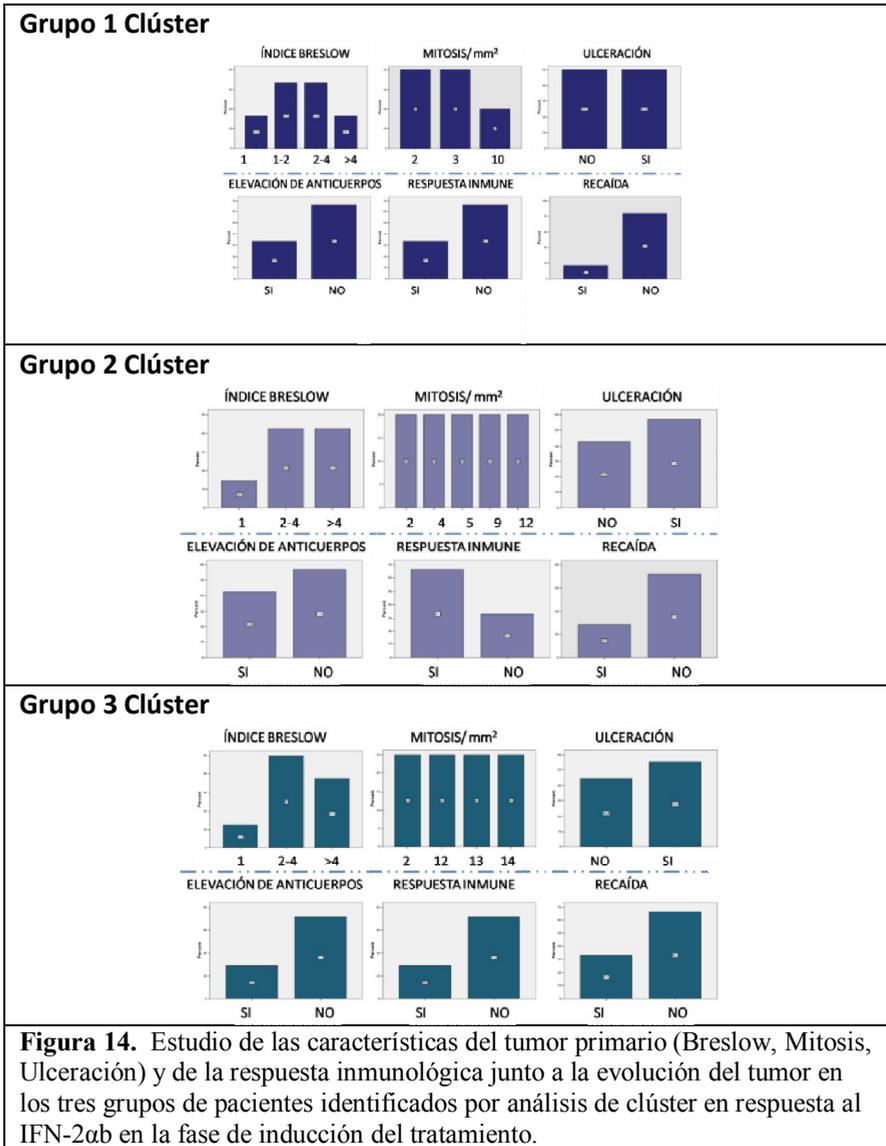


**Figura 12.-**Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las poblaciones leucocitos, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B y Células NK en pacientes con melanoma clasificados con o sin recidiva a lo largo de tratamiento

Resultados y desarrollo argumental



**Figura 13.**-Estudio comparativo de las variaciones del Ratio de las subpoblaciones de linfocitos T (Th1, Th2, Tc y Treg) y poblaciones de células dendríticas.( MDC y PDC) en los tres grupos de pacientes clasificados según ACJ.



### **6.3.2 Relevancia biológica y/o clínica de los resultados.**

Hay que destacar que nuestro trabajo debe considerarse como un estudio piloto en el que se presenta una prueba de concepto de la integración en el estudio de un tumor altamente relacionado con la inmunidad del huésped, como es el melanoma, de una técnica potente en el análisis inmunológico, como es la citometría de flujo, con una herramienta poderosa en el análisis multivariante avanzado, como es el Análisis de Clúster Jerárquico.

La aplicación del Análisis de Clústers Jerárquicos, como método multivariante basado en la interdependencia de variables, ha permitido integrar todos los datos citométricos y clínicos. Con esta aproximación se han distinguido tres clústers de pacientes según su respuesta inmunitaria a los 30 días de tratamiento. Estos grupos tienen expresión diferencial de factores pronósticos del melanoma y muestran diferentes respuestas inmunitarias durante el tratamiento.

Nuestro estudio es muy limitado en cuanto al número de pacientes y ello ha implicado que en muchos casos, las tendencias observadas, de claro interés inmunitario y de plausible explicación en el contexto de la respuesta inmunológica y de su relación con el progreso o el control del melanoma, carezcan de significación estadística.

Confiamos que en el futuro nuestra aproximación experimental y de integración e interpretación de resultados se pueda aplicar a colaboraciones con estudios de mayor envergadura en el área clínica de la Inmunología del Melanoma.

## **7 CONCLUSIONES.**

1. Mediante inmunofenotipaje por citometría de flujo multiparamétrica se ha determinado en un grupo de pacientes con melanoma la concentración en sangre periférica de un conjunto de poblaciones celulares relacionadas con la respuesta inmunitaria, incluyendo leucocitos totales, células NK, linfocitos B, subpoblaciones funcionales de linfocitos T (Tc, Th1, Th2, Treg) y subpoblaciones funcionales de células dendríticas (mieloides y plasmocitoides).

2. Se ha comparado el estado inmunitario de los pacientes con melanoma al diagnóstico y de un grupo control de donantes sanos, observándose un aumento significativo de los linfocitos Th2 y Treg en los pacientes, que sugiere un estado de posible supresión acompañado de una menor respuesta protectora de tipo celular, confirmando datos previos de nuestro grupo de investigación.

3. Se ha comparado el estado inmunitario de los pacientes con melanoma en distintos estadios, observándose que los cambios son más significativos en los Estadios II y III, con importante aumento progresivo de linfocitos Th2, linfocitos Treg, y células dendríticas mieloides. Estas observaciones sugieren que la intensidad de la disfunción de la respuesta protectora celular es paralela a la gravedad del melanoma.

4. Se ha comparado el estado inmunitario del grupo de pacientes con melanoma al diagnóstico y en diferentes puntos temporales del tratamiento con alta dosis de Interferón- $\alpha$ . El número absoluto de leucocitos disminuye de forma progresiva durante el tratamiento, pero retorna a un nivel normal en el día 180. La mayoría de células

### Conclusiones

inmunitarias analizadas siguen el mismo patrón de variación temporal, con excepción de los linfocitos Th2, que no se modifican, y los linfocitos Tc y las células dendríticas, que disminuyen progresivamente y no tienden a la recuperación a los 180 días del tratamiento. Estas observaciones demuestran efectos específicos del tratamiento en algunas subpoblaciones inmunitarias de relevancia.

5. Se ha realizado un estudio estadístico para comparar los cambios inmunitarios inducidos por el tratamiento ente subgrupos de pacientes estratificados por el estadio al diagnóstico; presencia o ausencia de ulceración en el tumor primario; presencia o ausencia de recidiva durante la fase de inducción y presencia o ausencia de respuesta inmunitaria reactiva. Las diferentes comparaciones muestran resultados muy complejos pero en general se observan ciertas tendencias

6. En los pacientes de Estadio III con respecto a los del Estadio II, el tratamiento tiende a disminuir las poblaciones celulares relacionadas con la respuesta defensiva celular, aumentando los linfocitos Th2 y la expresión de la molécula tolerogénica ILT-3 en células dendríticas.

7. En los pacientes con melanoma ulcerado con respecto a los no ulcerados, el tratamiento tiende a disminuir marcadamente las células Treg y las células dendríticas plasmocitoides, indicando un menor grado de inhibición de las respuestas protectoras de tipo celular.

8. En los pacientes con respuesta inmunitaria reactiva (sobre todo por anticuerpos) con respecto a los pacientes sin respuesta, el tratamiento tiende a disminuir marcadamente los linfocitos B, los linfocitos Th2 y las células Treg y las células dendríticas plasmocitoides, con un aumento de la molécula tolerogénica ILT-3 en todas las poblaciones de células dendríticas.

### Conclusiones

9. No se encontraron apenas diferencias entre los pacientes con recidiva y los que no recayeron, posiblemente debido a que sólo se pudo estudiar el punto temporal de 30 días.

10. La aplicación del Análisis de Clústers Jerárquicos, como método multivariante basado en la interdependencia de variables, ha permitido integrar todos los datos citométricos y clínicos. Con esta aproximación se han distinguido tres clústers de pacientes según su respuesta inmunitaria a los 30 días de tratamiento. Estos grupos tienen expresión diferencial de factores pronósticos del melanoma y muestran diferente respuestas inmunitarias durante el tratamiento.



## **8 BIBLIOGRAFIA**

(2012). FDA approves new melanoma treatments. *Johns Hopkins Med. Lett. Health After* 50 23, 3.

Adrián Cabestré, F., Moreau, P., Riteau, B., Ibrahim, E.C., Le Danff, C., Dausset, J., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Paul, P. (1999). HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J. Reprod. Immunol.* 43, 183–193.

Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85, 85–95.

Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., et al. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195, 1303–1316.

Ascierto, P.A., Napolitano, M., Celentano, E., Simeone, E., Gentilcore, G., Daponte, A., Capone, M., Caracò, C., Calemna, R., Beneduce, G., et al. (2010). Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon- $\alpha$  2b treatment. *J. Transl. Med.* 8, 76.

Ascierto, P.A., Marincola, F.M., and Atkins, M.B. (2015). What's new in melanoma? Combination! *J. Transl. Med.* 13, 213.

Aspord, C., Leccia, M.-T., Charles, J., and Plumas, J. (2014). Melanoma hijacks plasmacytoid dendritic cells to promote its own progression. *Oncoimmunology* 3, e27402.

Atkins, M.B., Lotze, M.T., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., et al. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 2105–2116.

Bacchetta, R., Gambineri, E., and Roncarolo, M.-G. (2007). Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 227–235; quiz 236–237.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.-J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., et al. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 6199–6206.

Ballantyne, A.D., and Garnock-Jones, K.P. (2013). Dabrafenib: first global approval. *Drugs* 73, 1367–1376.

Banham, A.H. (2006). Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol.* 27, 541–544.

Bao, L., Dunham, K., and Lucas, K. (2011). MAGE-A1, MAGE-A3, and NY-ESO-1 can be upregulated on neuroblastoma cells to facilitate cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor cell killing. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 60, 1299–1307.

Bos, J.D., and Luiten, R.M. (2009). Skin immune system. *Cancer Treat. Res.* 146, 45–62.

Botella-Estrada, R., Escudero, M., O'Connor, J.E., Nagore, E., Fenollosa, B., Sanmartín, O., Requena, C., and Guillén, C. (2005). Cytokine production by peripheral lymphocytes in melanoma. *Eur. Cytokine Netw.* 16, 47–55.

Botella-Estrada, R., Traves, V., Requena, C., Guillen-Barona, C., and Nagore, E. (2014). Correlation of histologic regression in primary melanoma with sentinel node status. *JAMA Dermatol.* 150, 828–835.

Botella-Estrada, R, Escudero M., O'Connor, J.E., Dasi, F., Fenollosa B, Nagore E., Sanmartín, O., Sevilla, A., Guillén, C. (2002) Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermosifiliogr.*; 93:87-101

Burns, E.M., and Yusuf, N. (2014). Toll-Like Receptors and Skin Cancer. *Front. Immunol.* 5.

Chang, C.-C., Campoli, M., Restifo, N.P., Wang, X., and Ferrone, S. (2005). Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing

machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1462–1471.

Chevolet, I., Schreuer, M., Speeckaert, R., Neyns, B., Hoorens, I., van Geel, N., Krüse, V., Hennart, B., Allorge, D., Van Gele, M., et al. (2015). Systemic immune changes associated with adjuvant interferon- $\alpha$ 2b-therapy in stage III melanoma patients: failure at the effector phase? *Melanoma Res.* *25*, 357–361.

Chow, Z., Mueller, S.N., Deane, J.A., and Hickey, M.J. (2013). Dermal regulatory T cells display distinct migratory behavior that is modulated during adaptive and innate inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 3049–3056.

Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J.H., Shoji, M., Sexton, D.G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., and Arbiser, J.L. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *8*, 3728–3733.

Cohen, J., and Sznol, M. (2015). Therapeutic combinations of immune-modulating antibodies in melanoma and beyond. *Semin. Oncol.* *42*, 488–494.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 1219–1226.

Cosmi, L., Annunziato, F., Galli, G., Manetti, R., Maggi, E., and Romagnani, S. (2001). CRTH2: marker for the detection of human Th2 and Tc2 cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *495*, 25–29.

Cui, J., Chen, Y., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2014). Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* *10*, 3270–3285.

Denfeld, R.W., Dietrich, A., Wuttig, C., Tanczos, E., Weiss, J.M., Vanscheidt, W., Schöpf, E., and Simon, J.C. (1995). In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *62*, 259–265.

Ding, L., Kim, M., Kanchi, K.L., Dees, N.D., Lu, C., Griffith, M., Fenstermacher, D., Sung, H., Miller, C.A., Goetz, B., et al. (2014). Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS One* 9, e111153.

Eggermont, A.M.M., Suciú, S., Testori, A., Santinami, M., Kruit, W.H.J., Marsden, J., Punt, C.J.A., Salès, F., Dummer, R., Robert, C., et al. (2012). Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation in resected stage III melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3810–3818.

Eggermont, A.M.M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J.-J., Dummer, R., Wolchok, J.D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P.A., Richards, J.M., et al. (2015). Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 16, 522–530.

Escobar C , Velásquez MM.( 2011). Células reguladoras en cáncer de piel melanomay no melanoma *Rev Asoc Colomb Dermatol.*; 19: 295-304.

Flaherty, L.E., Othus, M., Atkins, M.B., Tuthill, R.J., Thompson, J.A., Vetto, J.T., Haluska, F.G., Pappo, A.S., Sosman, J.A., Redman, B.G., et al. (2014). Southwest Oncology Group S0008: a phase III trial of high-dose interferon Alfa-2b versus cisplatin, vinblastine, and dacarbazine, plus interleukin-2 and interferon in patients with high-risk melanoma--an intergroup study of cancer and leukemia Group B, Children's Oncology Group, Eastern Cooperative Oncology Group, and Southwest Oncology Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 3771–3778.

Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.

Gershenwald, J.E., Soong, S., Balch, C.M., and American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee (2010). 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 1475–1477.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903–914.

Gilbert, A.E., Karagiannis, P., Dodev, T., Koers, A., Lacy, K., Josephs, D.H., Takhar, P., Geh, J.L.C., Healy, C., Harries, M., et al. (2011). Monitoring the systemic human memory B cell compartment of melanoma patients for anti-tumor IgG antibodies. *PLoS One* 6, e19330.

Gleason, B.C., Crum, C.P., and Murphy, G.F. (2008). Expression patterns of MITF during human cutaneous embryogenesis: evidence for bulge epithelial expression and persistence of dermal melanoblasts. *J. Cutan. Pathol.* 35, 615–622.

Green, J., and Ariyan, C. (2015). Update on immunotherapy in melanoma. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 24, 337–346.

Hauschild, A., Gogas, H., Tarhini, A., Middleton, M.R., Testori, A., Dréno, B., and Kirkwood, J.M. (2008). Practical guidelines for the management of interferon-alpha-2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer* 112, 982–994.

Herrera, G., Diaz, L., Martinez-Romero, A., Gomes, A., Villamón, E., Callaghan, R.C., and O'Connor, J.-E. (2007). Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 21, 176–182.

Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., and Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116, 1757–1766.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.

Ilkovich, D. (2011). Role of immune-regulatory cells in skin pathology. *J. Leukoc. Biol.* 89, 41–49.

Ju, X.-S., Hacker, C., Scherer, B., Redecke, V., Berger, T., Schuler, G., Wagner, H., Lipford, G.B., and Zenke, M. (2004). Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene* 331, 159–164.

Kaporis, H.G., Guttman-Yassky, E., Lowes, M.A., Haider, A.S., Fuentes-Duculan, J., Darabi, K., Whynot-Ertelt, J., Khatcherian, A., Cardinale, I., Novitskaya, I., et al. (2007). Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3<sup>+</sup> T cells in a Th2 dominant microenvironment. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2391–2398.

Kirkwood, J.M., Ibrahim, J.G., Sondak, V.K., Richards, J., Flaherty, L.E., Ernstoff, M.S., Smith, T.J., Rao, U., Steele, M., and Blum, R.H. (2000). High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 2444–2458.

Kirkwood, J.M., Ibrahim, J., Lawson, D.H., Atkins, M.B., Agarwala, S.S., Collins, K., Mascari, R., Morrissey, D.M., and Chapman, P.B. (2001a). High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the Multicenter Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E2696. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *19*, 1430–1436.

Kirkwood, J.M., Ibrahim, J.G., Sosman, J.A., Sondak, V.K., Agarwala, S.S., Ernstoff, M.S., and Rao, U. (2001b). High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *19*, 2370–2380.

Kiszner, G., Wichmann, B., Nemeth, I.B., Varga, E., Meggyeshazi, N., Teleki, I., Balla, P., Maros, M.E., Penksza, K., and Krenacs, T. (2014). Cell cycle analysis can differentiate thin melanomas from dysplastic nevi and reveals accelerated replication in thick melanomas. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *464*, 603–612.

Kotelevets, L., van Hengel, J., Bruyneel, E., Mareel, M., van Roy, F., and Chastre, E. (2001). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *J. Cell Biol.* *155*, 1129–1135.

Kupper, T.S., and Fuhlbrigge, R.C. (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 211–222.

Ladányi, A. (2015). Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 490–500.

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 23–34.

Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.

Lugli, E., Pinti, M., Nasi, M., Troiano, L., Ferraresi, R., Mussi, C., Salvioli, G., Patsekina, V., Robinson, J.P., Durante, C., et al. (2007). Subject classification obtained by cluster analysis and principal component analysis applied to flow cytometric data. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 71, 334–344.

Masopust, D., and Schenkel, J.M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 309–320.

Moretti, S., Spallanzani, A., Pinzi, C., Prignano, F., and Fabbri, P. (2007). Fibrosis in regressing melanoma versus nonfibrosis in halo nevus upon melanocyte disappearance: could it be related to a different cytokine microenvironment? *J. Cutan. Pathol.* 34, 301–308.

Neagu, M., Constantin, C., and Zurac, S. (2013). Immune parameters in the prognosis and therapy monitoring of cutaneous melanoma patients: experience, role, and limitations. *BioMed Res. Int.* 2013, 107940.

Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from

normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 6535–6545.

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 679–691.

Nooijen, P.T., Westphal, J.R., Eggermont, A.M., Schalkwijk, C., Max, R., de Waal, R.M., and Ruiter, D.J. (1998). Endothelial P-selectin expression is reduced in advanced primary melanoma and melanoma metastasis. *Am. J. Pathol.* *152*, 679–682.

Oble, D.A., Loewe, R., Yu, P., and Mihm, M.C. (2009). Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun. J. Acad. Cancer Immunol.* *9*.

O'Connor, J.E., Callaghan, R.C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M.D., and Montolíu, H. (2001). The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* *51*, 231–239.

Pasparakis, M., Haase, I., and Nestle, F.O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 289–301.

Patel, P.M., Suci, S., Mortier, L., Kruit, W.H., Robert, C., Schadendorf, D., Trefzer, U., Punt, C.J.A., Dummer, R., Davidson, N., et al. (2011). Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *47*, 1476–1483.

Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* *202*, 8–32.

Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., et al. (2012). Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res.* *72*, 1407–1415.

Quaglino, P., Marengo, F., Osella-Abate, S., Cappello, N., Ortoncelli, M., Salomone, B., Fierro, M.T., Savoia, P., and Bernengo, M.G. (2010). Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and

IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 21, 409–414.

Rafique, I., Kirkwood, J.M., and Tarhini, A.A. (2015). Immune Checkpoint Blockade and Interferon- $\alpha$  in Melanoma. *Semin. Oncol.* 42, 436–447.

Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J.S., Joshua, A.M., Hwu, W.-J., Gangadhar, T.C., et al. (2014). Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet Lond. Engl.* 384, 1109–1117.

Rotte, A., Bhandaru, M., Zhou, Y., and McElwee, K.J. (2015). Immunotherapy of melanoma: present options and future promises. *Cancer Metastasis Rev.* 34, 115–128.

Rouas-Freiss, N., Paul, P., Dausset, J., and Carosella, E.D. (2000). HLA-G promotes immune tolerance. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 14, 93–98.

Schatton, T., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., and Mihm, M.C. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1102, 287–324.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 1151–1164.

Serafini, P., Borrello, I., and Bronte, V. (2006). Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* 16, 53–65.

Speeckaert, R., van Geel, N., Vermaelen, K.V., Lambert, J., Van Gele, M., Speeckaert, M.M., and Brochez, L. (2011). Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 334–344

Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271–296.

Suciu-Foca, N., Manavalan, J.S., Scotto, L., Kim-Schulze, S., Galluzzo, S., Naiyer, A.J., Fan, J., Vlad, G., and Cortesini, R. (2005). Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int. Immunopharmacol.* 5, 7–11.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454.

Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., et al. (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 1020–1030.

Uribe, P., Andrade, L., and Gonzalez, S. (2006). Lack of association between BRAF mutation and MAPK ERK activation in melanocytic nevi. *J. Invest. Dermatol.* 126, 161–166.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81.

Vlad, G., Chang, C.-C., Colovai, A.I., Berloco, P., Cortesini, R., and Suciu-Foca, N. (2009). Immunoglobulin-like transcript 3: A crucial regulator of dendritic cell function. *Hum. Immunol.* 70, 340–344.

Vermi, W., Soncini, M., Melocchi, L., Sozzani, S., and Facchetti, F. (2011). Plasmacytoid dendritic cells and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 90, 681–690.

Viguiier, M., Lemaître, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., and Ferradini, L. (2004). Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit

Bibliografía

the function of infiltrating T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *173*, 1444–1453.

Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2007). Regulatory T cells and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 217–223.

Wilson, N.S., and Villadangos, J.A. (2004). Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* *82*, 91–98.

Wright, C.J.M., and McCormack, P.L. (2013). Trametinib: first global approval. *Drugs* *73*, 1245–1254.

Wushou, A., Hou, J., Zhao, Y.-J., and Miao, X. (2015). Postoperative adjuvant radiotherapy improves loco-regional recurrence of head and neck mucosal melanoma. *J. Cranio-Maxillo-Fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Fac. Surg.* *43*, 553–558.







